



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA  
(*Passiflora ligularis*) EN RATONES (*Mus musculus*)”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**MAYRA ALEJANDRA PALLO SARABIA**

**RIOBAMBA - ECUADOR**

**2012**

## *Dedicatoria*

Al Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Al mi madre por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

Al mi padre por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

Al mis queridos hermanos por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, demostrándome que con paciencia y sacrificio todo es posible.

Al mi esposo por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

Al mi hijita motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día,

Al mis amigas/os que siempre han estado en las buenas y en las malas apoyándome.

## Agradecimiento

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su aporte académico en mi formación profesional.

Al BQF. Fausto Contrero y Dra. Susana Abdo miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

Al BQF. Diego Vinuza por su valiosa colaboración y asesoramiento.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación “EVALUACION DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*) EN RATONES (*Mus musculus*)”, de responsabilidad de la señorita egresada Mayra Alejandra Pallo Sarabia, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez  
DECANA FACULTAD DE  
CIENCIAS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Iván Ramos  
DIRECTOR DE ESCUELA

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Fausto Contero  
DIRECTOR DE TESIS

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Susana Abdo  
MIEMBRO DE TRIBUNAL

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tec. Carlos Rodríguez  
DIRECTOR CENTRO  
DE DOCUMENTACIÓN

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

NOTA DE TESIS ESCRITA

\_\_\_\_\_

Yo, Mayra Alejandra Pallo Sarabia soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

**MAYRA ALEJANDRA PALLO SARABIA**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>OMS</b>	Organización mundial de la Salud
<b>TAG</b>	Trastorno de Ansiedad Generalizada
<b>TOC</b>	Trastorno Obsesivo - Compulsivo
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>MAO</b>	Monoaminooxidasa
<b>COMT</b>	Catecol-O- metiltransferasa
<b>GABA</b>	Ácido Gamma Amino Butírico
<b>5HT</b>	5-hidroxitriptamina
<b>MAO</b>	Mono Amino Oxidasa
<b>ACTH</b>	Adenocorticotropina
<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>BZD</b>	Benzodiacepínicos
<b>TA</b>	Trastornos de Ansiedad
<b>Acetil-Co A</b>	Acetil-Coenzima A
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>SNA</b>	Sistema Nervioso Autónomo
<b>SNS</b>	Sistema Nervioso Somático
<b>CCK</b>	Colesístoquinina
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>C<sub>6</sub></b>	Carbono 6
<b>C<sub>3</sub></b>	Carbono 3
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PAL</b>	Fenilalanina amonioliasa
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos
<b>BNZ</b>	Benzodiacepínicos
<b>BZ</b>	Benzodiacepinas
<b>Iv</b>	Intra venosa

<b>Im</b>	Intra muscular
<b>Min</b>	Minutos
<b>hrs.</b>	Horas
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>Min</b>	Minuto
<b>TAG</b>	Trastorno de Ansiedad Generalizada
<b>Tmax</b>	Temperatura máxima
<b>Cmax</b>	Concentración máxima
<b>CrCl</b>	Cloruro de cromo
<b>° F</b>	Grados Fahrenheit
<b>%H</b>	Porcentaje de Humedad
<b>Conc</b>	Concentrado
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>Rf</b>	Franja de referencia
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>1</b>
1.PARTE TEÓRICA .....	1
1.1 ANSIEDAD.....	1
1.1.1 CAUSA.....	2
1.1.2 TIPOS DE TRASTORNOS DE ANSIEDAD .....	3
1.1.2.1 TRASTORNO DE ANSIEDAD GENERALIZADA (TAG) .....	3
1.1.2.2 TRASTORNO OBSESIVO-COMPULSIVO (TOC).....	4
1.1.2.3 CRISIS DE ANGUSTIA.....	6
1.1.2.4 FOBIAS .....	7
1.1.2.5 TRASTORNO POR ESTRÉS POSTRAUMÁTICO .....	9
1.1.3SÍNTOMAS Y SIGNOS DE LA ANSIEDAD .....	10
1.1.4 DIAGNÓSTICO.....	11
1.1.5 BASES BIOLÓGICAS DE LA ANSIEDAD .....	12
1.1.5.1 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	12
1.1.5.2 NEUROTRANSMISORES EN LA RESPUESTA DE ANSIEDAD .....	14
1.2 LA MEDICINA TRADICIONAL .....	18
1.3 MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA .....	20
1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA.....	20
1.4 LA FITOTERAPIA .....	20
1.4.1 LA FITOFARMACOLOGÍA.....	21
1.5FORMAS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS.....	22



1.5.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	22
1.6 GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	23
1.6.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	24
1.6.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS:.....	24
1.6.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	26
1.6.4 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS .....	26
1.6.5 PRINCIPIOS ACTIVOS .....	27
1.6.5.1 FLAVONOIDES .....	27
1.6.5.1.1 BIOSÍNTESIS .....	28
1.6.5.1.2 CRISINA .....	29
1.6.5.2 ALCALOIDES .....	29
1.6.5.2.1 BIOSÍNTESIS .....	30
1.6.5.2.2 HARMANO .....	30
1.7 DIAZEPAM .....	31
1.7.1 CONTRAINDICACIONES .....	31
1.7.2 DURACIÓN DEL TRATAMIENTO .....	32
1.7.3 EFECTOS SECUNDARIOS.....	32
1.7.4 MECANISMO DE ACCIÓN .....	33
1.7.5 FARMACOCINÉTICA.....	33
1.8 <i>MUS MUSCULUS</i> .....	36
1.8.1 EL ANIMAL DE LABORATORIO .....	36
1.8.2 EL RATÓN, SU TAXONOMÍA Y USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO....	37
1.8.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE SU USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO .....	37
1.8.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL RATÓN.....	38
1.8.5 COMPORTAMIENTO DEL RATÓN.....	38

1.8.6 SISTEMA REPRODUCTIVO .....	39
1.8.8 MICROAMBIENTE Y MACROAMBIENTE .....	40
1.8.8.1 MICROAMBIENTE .....	40
1.8.8.1.1 CAJA O JAULA.....	41
1.8.8.1.2 RECOMENDACIONES DE ESPACIO (DENSIDAD ANIMAL) .....	41
1.8.8.1.3 LECHO O CAMA .....	42
1.8.8.1.4 AGUA DE BEBIDA .....	43
1.8.8.1.5 ALIMENTO: DIETAS Y REQUERIMIENTOS .....	43
1.8.8.2 MACROAMBIENTE.....	45
1.8.8.2.1 AIRE Y VENTILACIÓN.....	45
1.8.8.2.2 TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA .....	46
1.8.8.2.3 INTENSIDAD DE LUZ Y TIPO DE ILUMINACIÓN.....	46
1.8.8.2.4 RUIDO .....	47
1.8.8.2.5 OLOR .....	47
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>48</b>
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	48
2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	48
2.2 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS.....	48
2.2.1 MATERIALES .....	48
2.2.1.1 VEGETAL.....	48
2.2.1.2 EXTRACTO .....	48
2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO.....	48
2.2.2.1 MATERIALES Y REACTIVOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA (ENSAYO PRE CLÍNICO) .....	49
2.2.2.2 MATERIALES Y REACTIVOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA (ENSAYO CLÍNICO).....	50
2.2.3 EQUIPOS .....	50

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS .....	50
2.3.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO.....	50
2.3.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD .....	50
2.3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES.....	51
2.3.1.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA .....	52
2.3.1.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO.....	53
2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO .....	53
2.4.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF .....	54
2.4.2 ENSAYO DE MAYER .....	55
2.4.3 ENSAYO DE WAGNER.....	55
2.4.4 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD.....	55
2.4.5 ENSAYO DE BORNTRAGER.....	56
2.4.6 ENSAYO DE BALJET .....	56
2.4.7 ENSAYO DE SUDÁN.....	57
2.4.8 ENSAYO DE CATEQUINAS .....	57
2.4.9 ENSAYO DE RESINAS .....	57
2.4.10 ENSAYO DE LA ESPUMA .....	57
2.4.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO .....	58
2.4.12 ENSAYO DE LA NINHIDRINA .....	58
2.4.13 ENSAYO DE SHINODA.....	58
2.4.14 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS .....	59
2.4.15 ENSAYO DE FEHLING .....	59
2.5 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	60
2.5.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	60
2.5.1.1 MOLIENDA.....	60

2.5.1.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	61
2.5.1.3 CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO.....	62
2.5.2CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	63
2.5.3 CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS.....	64
2.6 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO DE LAS FLORES DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	65
2.6.1 TÉCNICA.....	65
2.6.2 BIOENSAYO.....	65
2.6.2.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA (TEST DEL LABERINTO).....	66
2.6.2.2 TEST DE CURIOSIDAD.....	67
2.6.2.3. TEST DE INCAPACITACIÓN MOTRIZ (TEST DE LA CHIMENEA).....	68
2.6.2.4 TEST DE ACTIVIDAD MIORELAJANTE (TEST ROTA – ROD).....	69
2.6.3 TÉCNICA PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA.....	69
<b>CAPÍTULOIII.....</b>	<b>71</b>
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE LA FLOR DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	71
3.1.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO.....	71
3.1.1.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	71
3.1.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES.....	72
3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO FLUIDO DE LA FLOR DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	73
3.2.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	73
3.2.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	75

3.2.3 CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS.....	77
3.3 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA.....	78
3.3 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO DE LA FLOR DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ) EN RATONES ( <i>MUS MUSCULUS</i> ).....	79
3.3.1 EVALUACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS CON RESPECTO A VARIOS TRATAMIENTOS APLICADOS EN LA INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO DE FLOR DE GRANADILLA ( <i>PASSIFLORA LIGULARIS</i> ).....	78
3.3 TOXICIDAD AGUDA Y ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	88
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>90</b>
4. CONCLUSIONES.....	90
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>91</b>
5. RECOMENDACIONES.....	91
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>92</b>
6. RESUMEN.....	92
CAPÍTULO VII.....	94
7. BIBLIOGRAFÍA.....	94
<b>CAPÍTULO VIII.....</b>	<b>104</b>
8. ANEXOS.....	104

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N° 1.</b> Humedad de la droga seca de las flores de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	71
<b>CUADRO N° 2.</b> Cenizas totales, solubles en agua e insolubles en hcl de la droga seca de las flores de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	72
<b>CUADRO N° 3.</b> Tamizaje fitoquímico del extracto de droga seca de la flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	73
<b>CUADRO N° 4.</b> Rf de la cromatografía en capa fina del extracto de la flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	75
<b>CUADRO N° 5.</b> Rf de la cromatografía en capa fina del extracto de la flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	76
<b>CUADRO N° 6.</b> Cuantificación de alcaloides de la flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ) utilizando datos bibliográficos como referencia .....	77
<b>CUADRO N° 7.</b> Cuantificación de flavonoides de la flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ) utilizando crisina como muestra estandar.....	77
<b>CUADRO N° 8.</b> Investigación del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ) a una concentración del 100%, 70% y 40%, blanco (agua destilada), estándar químico (diazepam) y natural ( <i>Passiflora edulis</i> ), test de actividad exploratoria (laberinto).....	80
<b>CUADRO N° 9.</b> Comparaciones múltiples tuckey al 99% de confianza, test de actividad exploratoria (laberinto).....	81
<b>CUADRO N° 10.</b> Investigación del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ) a una concentración del 100%, 70% y 40%, blanco	

(agua destilada), estándar químico (diazepam) y natural ( <i>Passiflora edulis</i> ), test incapacitación motriz (chimenea).....	82
<b>CUADRO N° 11.</b> Comparaciones múltiples tuckey al 99% de confianza, incapacitación motriz (chimenea).....	83
<b>CUADRO N° 12.</b> Investigación del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla ( <i>passiflora ligularis</i> ) a una concentración del 100%, 70% y 40%, blanco (agua destilada), estándar químico (diazepam) y natural ( <i>passiflora edulis</i> ), test de actividad miorelajante (rota-rod).....	84
<b>CUADRO N° 13.</b> Comparaciones múltiples tuckey 99% de confianza, test de actividad miorelajante (rota-rod).....	85
<b>CUADRO N° 14.</b> Reporte de signos clínicos de los ratones en prueba de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla <i>passiflora ligularis</i> aplicando una concentración de 0.01 mg/kg de peso.....	86

## INDICE DE GRAFICOS

<b>GRAFICO 1.</b>	Curva de calibracion crisina.....	78
<b>GRAFICO 2.</b>	Determinacion de la actividad exploratoria (laberinto) a los 30 minutos de la administracion de cada sustancia.....	80
<b>GRAFICO 3.</b>	Determinacion test de curiosidad a los 30 minutos de la administracion de cada sustancia.....	82
<b>GRAFICO 4.</b>	Determinacion test incapacitacion motriz (chimenea) a los 30 minutos de la administracion de cada sustancia.....	84
<b>GRAFICO 5.</b>	Determinacion de la actividad miorelajante (rota-rod) a los 30 minutos de la administracion de cada sustancia.....	86



## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Ansiedad.....	1
<b>FIGURA 2.</b>	Diagnostico.....	11
<b>FIGURA 3.</b>	Composición química granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	26
<b>FIGURA 4.</b>	Ruta de biosíntesis de flavonoides en las plantas.....	28
<b>FIGURA 5.</b>	Fórmula molecular de la crisina.....	29
<b>FIGURA 6.</b>	Biosíntesis de los alcaloides indólicos.....	30
<b>FIGURA 7.</b>	Fórmula molecular del harmano.....	30
<b>FIGURA 8.</b>	Microambiente y macroambiente del ratón.....	40
<b>FIGURA 9.</b>	Extracción del material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico.....	54
<b>FIGURA 10.</b>	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.....	54

## INDICE DE FOTOGRAFIAS

<b>FOTOGRAFÍA 1.</b>	Granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	23
<b>FOTOGRAFÍA 2.</b>	<i>Mus musculus</i> .....	36
<b>FOTOGRAFIA 3.</b>	Recomendaciones de espacio.....	42
<b>FOTOGRAFÍA 4.</b>	Lecho o cama.....	42
<b>FOTOGRAFÍA 5.</b>	Bebedero.....	43
<b>FOTOGRAFÍA 6.</b>	Alimento.....	44
<b>FOTOGRAFÍA 7.</b>	Alimento y bebedero.....	45
<b>FOTOGRAFÍA 8.</b>	Molienda.....	61
<b>FOTOGRAFÍA 9.</b>	Molienda.....	61
<b>FOTOGRAFÍA 10.</b>	Molienda.....	61
<b>FOTOGRAFÍA 11.</b>	Concentracion del extracto.....	62
<b>FOTOGRAFÍA 12.</b>	Test del laberinto.....	66
<b>FOTOGRAFÍA 13.</b>	Test de curiosidad.....	67
<b>FOTOGRAFÍA 14.</b>	Test de la chimenea.....	68
<b>FOTOGRAFÍA 15.</b>	Test rota –rod.....	69
<b>FOTOGRAFÍAS 16-17.</b>	Cromatografia flavonoides.....	75
<b>FOTOGRAFÍAS 18.</b>	Cromatografia alcaloides.....	76

## **INDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1.</b> Espacios recomendados para ratones de laboratorio.....	42
<b>TABLA 2.</b> Alimento y requerimientos para ratones.....	45

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b>	Secado y molienda de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	104
<b>ANEXO 2.</b>	Concentración del extracto de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	104
<b>ANEXO 3.</b>	Determinación de humedad y cenizas de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	105
<b>ANEXO 4.</b>	Tamizaje fitoquímico del extracto de flore de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	106
<b>ANEXO 5.</b>	Cromatografía en capa fina del extracto de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	107
<b>ANEXO 6.</b>	Cuantificación de los principios activos por espectrofotometría.....	108
<b>ANEXO 7.</b>	Administracion.....	108
<b>ANEXO 8.</b>	Extraccion de los organos.....	109
<b>ANEXO 9.</b>	Protocolo histopatologico de ratone ( <i>muss musculus</i> ) que se les administro extracto hidroalcoholico de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ).....	110
<b>ANEXO10.</b>	ANOVA.....	111

## INTRODUCCIÓN

En un mundo tan convulsionado por las dificultades económicas, sociales y políticas han dado como producto que el psiquismo del ser humano se vea trastocado y haya dado como respuesta enfermedades de tipo psico-somático que conllevan a un comportamiento fuera de los esquemas de la normalidad, siendo el más frecuente el trastorno de la ansiedad.

En la actualidad es provocada la mayor parte de veces por el diario vivir en una sociedad caotizada que avanza a pasos agigantados, en el que nos vemos inmersos como parte principal del adelanto de los pueblos, y vivimos enfrentándonos a nuevos retos sociales, económicos y de salud siendo este último el más preocupante pues cada vez hay una mayor incidencia del trastorno de ansiedad en nuestra sociedad sin importar la edad, la raza o el sexo, por lo que se la ha posesionado como la enfermedad del milenio. (3)

El término de ansiedad fue utilizado por primera vez en el siglo XVIII, por el fisiólogo Escocés William Collen, para describir una aflicción del sistema nervioso.

Los síntomas característicos de los trastornos de ansiedad se manifiestan externamente como reacciones desproporcionadas ante estímulos o situaciones ambientales cotidianas, que por lo general estas reacciones escapan del control voluntario de la persona, presentando un carácter intenso, incomodidad y malestar que interfieren negativamente en su vida. Por lo que es un estado psicológico cuyos efectos interfieren en la realización de tareas que exigen focalización y mantenimiento amplio de la concentración. (18)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001 situaban en aproximadamente 450 millones el número de personas aquejadas por este tipo de trastorno mental. En sí, la angustia o indicadores estresantes están en todos lados y ámbitos como el educativo, familiar, social y laboral. Respecto a este último, se manejan datos alarmantes sobre la ansiedad y sus componentes estresantes; un análisis con relación al ministerio del trabajo, expresan que un 52% de empleados han padecido de ansiedad o preocupaciones y que esta cifra podría incrementarse a un 70%, debido a las diferentes demandas actuales del medioambiente. Estos datos reflejan una actualidad de nuestro marco laboral a nivel de la salud mental. (29)

Una de las terapias medicamentosas es la utilización de ansiolíticos prescritos por un médico los cuales son en su mayoría sintéticos, que deben ser administrados bajo vigilancia, ya que suelen tener contraindicaciones importantes, son incompatibles con muchos otros medicamentos y además pueden crear dependencia, si la dosis no es adecuada o el seguimiento no se realiza por un profesional. (60)

Los ansiolíticos de origen sintético prescritos para la ansiedad provocan un efecto conocido como rebote, es decir, que después de consumirlos por varios meses los síntomas de la depresión o ansiedad se vuelven más intensos por lo que es necesario aumentar la dosis. (60)

Los ansiolíticos naturales cumplen el mismo rol que las benzodiacepinas pues ayudan al paciente a calmar los síntomas de la ansiedad. La diferencia con los psicofármacos sintéticos es que no producen efectos adversos durante el tratamiento. (60)

Una de las alternativas con el uso de plantas medicinales es la *Passiflora* (*Passiflora ligularis*), conocida también como granadilla, flor de la pasión o pasionaria, especie utilizada por su propiedad ansiolítica, por lo que se realizó el estudio comparativo con la *Passiflora edulis*, que es la especie que se está utilizando en el mercado comercial en medicamentos que se expenden en farmacias y centros naturistas en la presentación de jarabes y tinturas.

En nuestra sociedad, es muy usada la terapia empírica del uso de flor de granadilla en infusiones para calmar el trastorno de la ansiedad, por personas que no acuden al médico y buscan sentirse mejor frente a la ansiedad; esto se debe a que la especie *Passiflora ligularis* es típica de la zona templada encontrándola durante gran parte del año en lugares como el cantón Guano y Penipe, además una gran producción en la provincia de Tungurahua en los cantones: Baños, Patate y Pelileo, siendo estos lugares los más cercanos a la ciudad de Riobamba. Al conocer este procedimiento empírico del uso de la *Passiflora* y la frecuencia con la que las personas beben la infusión de esta planta se ha validado científicamente la actividad ansiolítica de esta planta.

Enfatizado lo anterior, el presente trabajo de investigación ha buscado obtener el extracto hidroalcohólico de la flor de granadilla (*Passiflora ligularis*) por percolación y efectuar su control de calidad, evaluar la actividad ansiolítica de los extractos en ratones (*Mus musculus*) a través del ensayo de la Actividad Exploratoria, test de Curiosidad, test

de Incapacitación Motriz y test de Actividad Mio relajante y evaluar la toxicidad aguda del extracto de la flor de granadilla (*Passifloraligularis*) en ratones (*Mus musculus*).

## CAPÍTULO I

### 1. PARTE TEÓRICA

#### 1.1 ANSIEDAD

El término ansiedad, proviene del latín "anxietas", congoja o aflicción. Consiste en un estado de malestar psicofísico caracterizado por una sensación de inquietud, intranquilidad, inseguridad o desosiego ante lo que se vivencia como una amenaza inminente y de causa indefinida. La diferencia básica entre la ansiedad normal y la patológica, es que ésta última se basa en una valoración irreal o distorsionada de la amenaza. Cuando la ansiedad es muy severa y aguda, puede llegar a paralizar al individuo, transformándose en pánico. (29)



FUENTE: ANSIEDAD. <http://www.curaporhierbas.com.ar/como-controlar-la-ansiedad>

**FIGURA 1. ANSIEDAD**

La ansiedad es un estado psicológico que se retroalimenta y cuyos efectos interfieren en la realización de tareas que exijan focalización y mantenimiento prolongado de la concentración, y se hace presente en individuos de cualquier clase, raza, sexo y religión. Así mismo, acompaña frecuentemente a una gran gama de los trastornos psicológicos y psicosomáticos de la clasificación nosológica y es una de las



principales causas de asistencia servicios de salud mental. Se ha abordado su análisis de diferentes enfoques teóricos que, con mayor o menor éxito, se han ido acercando a su explicación y control (Sandín y Chorot, 1995). (29)

La ansiedad es un estado emocional negativo que incluye sensaciones de nerviosismo, preocupación y aprensión, relacionadas con la activación o el Arousal\* del organismo. Por lo tanto la ansiedad tiene un componente de pensamiento (por ejemplo, la preocupación y la aprensión) llamada ansiedad cognitiva, un componente de ansiedad somática, que constituye el grado de actividad física percibida. (29)

### **\*Arousal**

Es una activación general fisiológica y psicológica del organismo (personal), variable a lo largo de un continuo que va desde el sueño profundo hasta la excitación intensa. El término hace referencia a las dimensiones de la motivación en cuanto a la intensidad en un momento concreto, es un continuo. Las personas con un arousal elevado están mentalmente activadas y experimentan un aumento de su ritmo cardíaco, de la respiración y de la transpiración. Pero el arousal no se asocia automáticamente a sucesos agradables o desagradables. Una persona puede tener un arousal alto al saber que se gana un millón de dólares, pero puede ser igualmente alto al recibir una noticia de la muerte de un ser querido. (51)

#### **1.1.1 CAUSA**

Las causas fundamentales de la ansiedad se encontrarían entre los factores genéticos, existiendo una predisposición al trastorno, aunque se desconoce su contribución exacta y el tipo de educación en la infancia y la personalidad, presentando mayor riesgo aquellas personas con dificultad para afrontar los acontecimientos estresantes. Entre los factores precipitantes de la enfermedad estarían los acontecimientos estresantes, en particular las dificultades en las relaciones interpersonales, las enfermedades físicas y los problemas laborales. Los trastornos de ansiedad pueden hacerse crónicos si persisten los acontecimientos estresantes que los han provocado o se mantienen estilos de pensamiento

que ocasionan un temor a la presentación de los síntomas, creándose un círculo vicioso entre la ansiedad y el temor a presentarla. (19)

### 1.1.2 TIPOS DE TRASTORNOS DE ANSIEDAD

La ansiedad no es una enfermedad con un cuadro sintomático único. Existen varios tipos de ansiedad, varias vertientes de esta enfermedad como el TAG (Trastorno de Ansiedad Generalizado) suele ser el más común, pero no el único. Los trastornos obsesivos-compulsivos, las crisis de angustia, la fobia social y los trastornos pos-traumáticos son sólo algunos de estos desordenes que pueden afectar la vida del individuo y que pueden interferir en su quehacer diario.(59) (61) (62)

#### 1.1.2.1 Trastorno de ansiedad generalizada (TAG)

Normalmente cualquier persona puede sentirse puntualmente preocupada por algún problema en concreto que surge en su vida laboral o en el plano personal. Es normal preocuparse si surgen problemas en el ámbito económico o familiar, pero el Trastorno de Ansiedad Generalizada presenta una preocupación excesiva y constante respecto a diversos temas, pese a que el individuo no esté sufriendo ningún problema importante en particular. Mucha gente la sufre después de un acontecimiento importante en su vida laboral o quehacer diario, y también es habitual encontrarla en individuos que han experimentado una pérdida traumática. Si bien se desconoce la causa concreta del apareamiento de este trastorno, se piensa que existe una reducción en la sensibilidad a los receptores adrenérgicos. También una excesiva actividad serotoninérgica en áreas cerebrales como el rafe, el hipotálamo, los ganglios basales y el sistema límbico. (59) (61) (62)

Padecer este trastorno significa anticipar, casi siempre, desastres o consecuencias negativas, preocupaciones frecuentes y excesivas por la salud, el dinero, la familia o el trabajo. Esto hace que el individuo afectado acabe instalándose en un estado constante de inquietud que interfiere en los mencionados ámbitos de su vida y que debe ser reconocido y tratado adecuadamente.(59) (61) (62)

### **Síntomas comunes**

El trastorno de ansiedad generalizada puede incluir estos síntomas:

- ♣ Preocupación
- ♣ Ansiedad
- ♣ Dolores de cabeza
- ♣ Sensación de inquietud
- ♣ Sensación de irritabilidad
- ♣ Temblores
- ♣ Problemas para dormir
- ♣ Tensión muscular
- ♣ Facilidad para cansarse
- ♣ Problemas de concentración(55)(63)

#### **1.1.2.2 Trastorno obsesivo-compulsivo (TOC)**

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) estuvo considerado hasta hace algunos años como una enfermedad psiquiátrica rara que no responde al tratamiento. Actualmente es reconocido como un problema común que afecta al dos por ciento de la población. El TOC es un trastorno perteneciente al grupo de los trastornos de ansiedad caracterizado por:

**Obsesiones:** Son ideas, pensamientos, imágenes o impulsos recurrentes y persistentes que no son experimentados como producidos voluntariamente, sino más bien como pensamientos que invaden la conciencia y que son vividos como repugnantes o sin sentido.

**Compulsiones:** Son conductas repetitivas y aparentemente finalistas, que se realizan según determinadas reglas de forma estereotipada. El acto se realiza con una sensación de compulsión subjetiva junto con un deseo de resistir a la compulsión, por lo menos inicialmente (64).

Según esto se puede dar varios tipos de predominancias que deben requerir tratamientos distintos:

- ♣ **Predominio de pensamientos o rumiaciones obsesivos.** Ideas, imágenes mentales o impulsos a actuar. A pesar de que su contenido es variable, suelen venir acompañados de un malestar subjetivo. La consideración indecisa de alternativas es un elemento importante en las rumiaciones obsesivas.
- ♣ **Predominio de actos compulsivos (rituales obsesivos).** La mayoría se relacionan con la limpieza (en particular con el lavado de las manos), con comprobaciones repetidas para asegurarse de que se ha evitado una situación potencialmente peligrosa. Estos rituales pueden ocupar muchas horas del día y suelen venir acompañados de una marcada incapacidad de decisión.
- ♣ **Con mezcla de pensamientos y actos obsesivos.** La mayoría presenta una mixtura de ambos, tanto de pensamientos obsesivos como de comportamientos compulsivos.(59) (61) (62)

**SÍNTOMAS:** Las obsesiones y compulsiones más frecuentes en personas con TOC incluyen:

### **Obsesiones**

- ♣ Temor a contaminarse
- ♣ Temor a causar daños a otros o a que le pase algo a los padres, familia
- ♣ Ideas agresivas o de contenido sexual
- ♣ Escrupulosidad /religiosidad excesiva
- ♣ Pensamientos prohibidos
- ♣ Necesidad de simetría
- ♣ Necesidad de decir o confesar

### **Compulsiones**

- ♣ Lavarse
- ♣ Repetir una acción hasta hacerla 'bien'

- ♣ Asegurarse de haber cerrado la puerta, de haber cerrado el agua
- ♣ Contar objetos o hasta un determinado número
- ♣ Ordenar
- ♣ Acumular (no poder tirar nada)
- ♣ Rezar (64)

### **1.1.2.3 Crisis de angustia**

También conocidas como ataques de pánico. Las crisis de angustia suelen aparecer inesperadamente. Sin previo aviso, el individuo comienza a sentir un fuerte sentimiento de miedo y angustia creciente que suele venir acompañado de una sensación de mareo y malestar general. Las crisis de angustia pueden provocar incluso el desvanecimiento y no tienen por qué estar particularmente relacionadas con un proceso de crisis de la persona. Esta puede ser perfectamente feliz en todos los planos de su existencia y sufrir, repentinamente, una de estas crisis, aparentemente sin razón alguna. Pueden suceder durante una reunión social, cualquier actividad cotidiana o sin importancia y la principal diferencia existente entre estos y la ansiedad en sí misma es la duración y la intensidad: mientras la ansiedad es un proceso acumulativo y creciente en el tiempo (aunque menos intenso), las crisis de angustia o ataques de pánico son cortos, repentinos, pero eminentemente intensos y de una gravedad inmediata. No hay una duración determinada, pero por lo general estas crisis pueden tener una duración de entre 10 y 30 minutos. Suelen clasificarse en tres categorías: crisis de angustia repentinas e inesperadas; aquellas que se desencadenan a raíz de una situación o contexto específicos (por ejemplo, un lugar público atestado de gente); y aquellas que, se dan en esas mismas situaciones, pero con la diferencia que puede pasar tiempo en el transcurso de una actividad antes de que estas se den (por ejemplo, un orador que lleva 15 minutos hablando ante un auditorio, y empieza a manifestar los síntomas de una crisis). Estos dos últimos tipos de crisis de angustia propician que algunos individuos sean capaces de anticiparse a las mismas, evitando las situaciones concretas o lugares que las provocaron anteriormente. (59) (61) (62)

## **Síntomas comunes**

Los ataques de pánico pueden causar síntomas físicos como:

- ♣ Latidos violentos
- ♣ Dolor de pecho
- ♣ Sensación de falta de aliento
- ♣ Sensación de mareo
- ♣ Cosquilleo o adormecimiento
  - \* Sofocos o escalofríos
  - \* Náuseas
  - \* Sensación de asfixia

### **1.1.2.4 Fobias**

Cabe distinguir los miedos habituales, los cuales todos tenemos, de las fobias. Toda persona tiene sus propios pequeños miedos irracionales, desde a ciertos animales a algunas situaciones como subirse a un avión o conducir. Sin embargo, estos miedos pasan a convertirse en fobia desde el mismo momento que, estos son tan intensos que interfieren en el día a día del sujeto. Una fobia se define generalmente como un miedo irracional compulsivo hacia alguien o algo que se presume completamente inofensivo. De los distintos tipos de trastornos de la ansiedad, la fobia es el más común de todos. En 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que al menos 2,5 millones de españoles padecían algún tipo de fobia. Esta cifra implica que el 5,9% de la población adulta española padece alguno de estos trastornos de la ansiedad, un porcentaje que, aun así, se sitúa algo debajo de la media europea, la cual alcanza un 6,4. (59) (61) (62)

Generalmente, se clasifican las fobias en tres tipos:

**a) Fobias específicas.** Miedos irracionales a situaciones u objetos concretos. Se clasifican a su vez en:

- ♣ Fobias animales

- ♣ Fobias ambientales. Incluyen la fobia a las alturas, a las tormentas, al agua o a la oscuridad
- ♣ Fobias situacionales. Provocadas por una situación específica que dispara la fobia. El miedo a los espacios cerrados o claustrofobia, el miedo a ascensores, a volar, a los túneles o a los puentes serían sólo algunas de ellas.
- ♣ Fobia a la sangre, a las inyecciones y al daño físico
- ♣ Otras fobias. Aquí caben múltiples fobias no clasificables en los anteriores campos. Desde fobia a ahogarse a el miedo a la enfermedad o a la muerte. (59) (61) (62)

**b) Fobia social.** Generalmente implica un miedo desaforado por parte del individuo a verse humillado, reprendido o maltratado en público. En casos extremos, esta lleva al individuo al aislamiento y a evitar el contacto social.

### **Síntomas comunes**

Hay varios síntomas que se presentan con el trastorno de ansiedad social, tales como:

- ♣ Una fuerte sensación de temor y nerviosismo en situaciones sociales o cuando es el centro de atención
- ♣ Evasión de las situaciones sociales
- ♣ Sonrojo
- ♣ Sudoración
- ♣ Latidos violentos
- ♣ Voz temblorosa
- ♣ Temblores
- ♣ Náuseas
- ♣ Diarrea

**c) Agorafobia.** Aunque tradicionalmente se ha entendido la agorafobia como el miedo a los espacios abiertos, la palabra ha adoptado un nuevo significado en nuestros días. Hoy la agorafobia implica miedo a encontrarse en lugares frecuentados por masas y

de los que es difícil escapar, o en los que sería difícil recibir ayuda en caso de cualquier tipo de complicación. Las personas que la padecen suelen haber sufrido crisis de ansiedad e incluso ser reincidentes en las mismas, lo que les lleva a querer evitar determinadas situaciones y lugares y, por lo tanto, caer en la agorafobia.(59) (61) (62)

#### **1.1.2.5 Trastorno por estrés postraumático**

Surge como respuesta tardía o diferida a un acontecimiento estresante o a una situación de naturaleza excepcionalmente amenazante o catastrófica que causaría malestar generalizado en cualquier sujeto que haya sufrido una experiencia similar. Se trata de un trastorno discapacitante que puede surgir como respuestas a acontecimientos traumáticos tales como violaciones, abusos sexuales, torturas, secuestros, catástrofes naturales, accidentes o muertes traumáticas de seres cercanos. Este trastorno se caracteriza por episodios reiterados de volver a vivenciar el trauma en forma de reviviscencias o sueños que acaban formando un embotamiento emocional. En algunos casos, pueden pasar años hasta que este trastorno presente sus primeras manifestaciones, y en raras ocasiones puede hacerlo a través de estallidos dramáticos y agudos de miedo, pánico o agresividad, desencadenados por estímulos que evocan un repentino recuerdo, una actualización del trauma o de la reacción original frente a él o ambos a la vez. Si las manifestaciones se dan con una tardanza considerable, las secuelas de ese estrés devastador pueden desembocar en una neurosis traumática.

Es característico que asociado a esto la persona haya logrado controlar sus emociones a tal punto que logra "no sentir nada". Todos estos síntomas deben ser tan extremos que afectan el funcionamiento de la persona. Las personas que sufren de este trastorno tienen su vida entera limitada por las consecuencias de lo ocurrido en el pasado. Que le pase a unos y a otros no bajo las mismas circunstancias está relacionado con los pensamientos y sentimientos de la persona en el momento del trauma, y las fortalezas y defensas personales de cada persona al entrar en la situación.(59) (61) (62)



## **Síntomas comunes**

Entre los síntomas de trastorno por estrés postraumático, se pueden mencionar:

- ♣ Pesadillas o recuerdos (*flashbacks*) sobre el evento doloroso que causan sentimientos intensos de enojo y miedo, y perturban la vida diaria
- ♣ Evasión de sensaciones, amigos y recordatorios asociados con el evento doloroso
- ♣ Sensación de irritabilidad e inquietud, problemas para concentrarse y para dormir
- ♣ Síntomas físicos como dolores de cabeza, problemas estomacales, mareos, dolores de pecho y otros dolores
- ♣ Actuar o sentir como si el evento traumático estuviera sucediendo nuevamente.(59) (61) (62)

### **1.1.3 SÍNTOMAS Y SIGNOS DE LA ANSIEDAD**

La ansiedad es un estado emocional que produce síntomas, cuando los mecanismos de defensa no pueden resolver de buena forma, este estado de tensión o alerta emocional. Estos síntomas son respuestas fallidas de los mecanismos de defensa, que han fracasado en el mantenimiento del equilibrio emocional. (58)

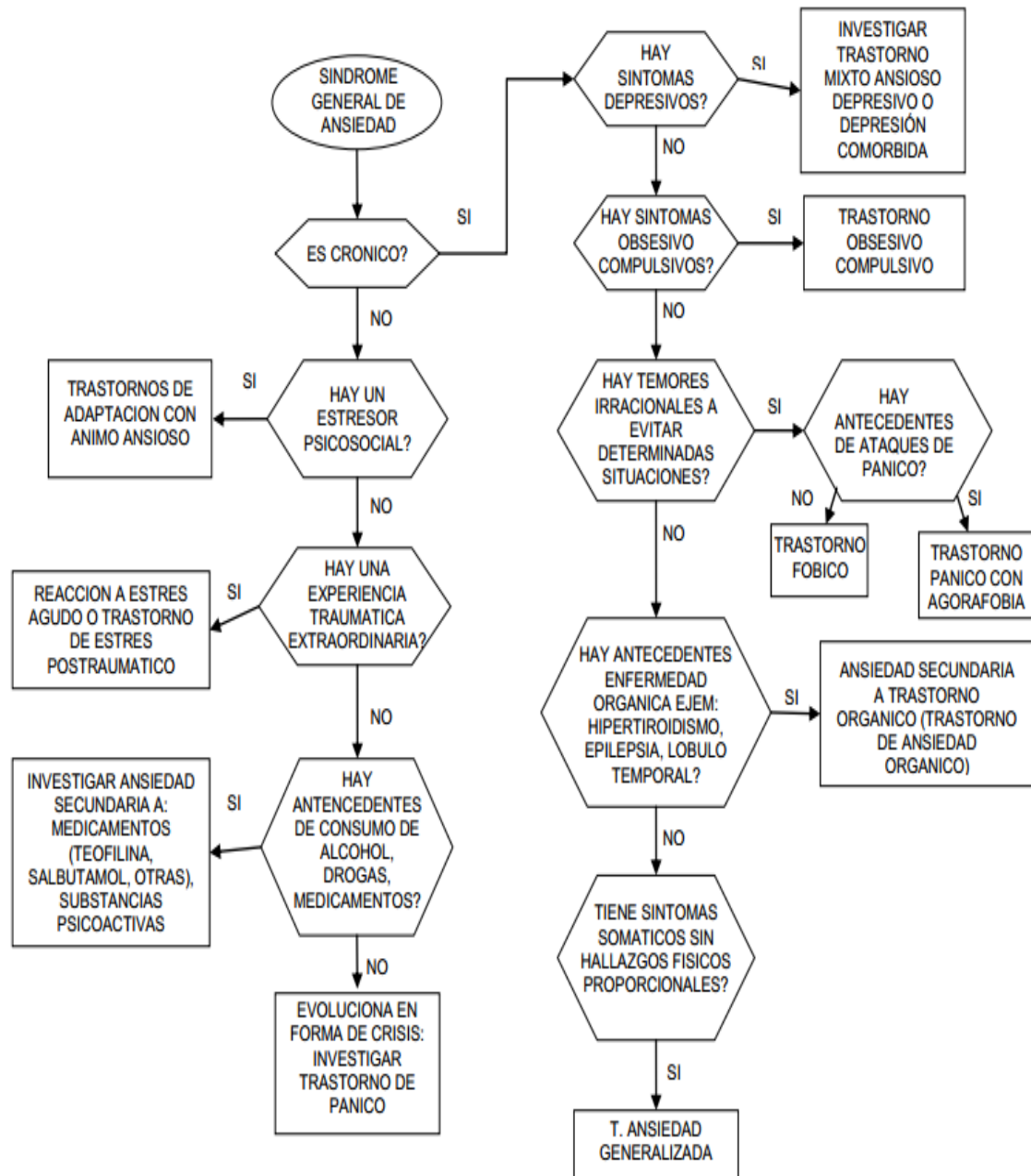
Los principales síntomas de la ansiedad los podemos dividir en dos grandes grupos, los PSICOLÓGICOS que se caracterizan por tensión, temores, dificultad de concentración y aprensión. Y los SOMÁTICOS que están dados por taquicardia, hiperventilación, palpitaciones, temblor y sudación.

Los trastornos simpaticomiméticos de ansiedad son una respuesta a un estado del SNC y un refuerzo de mayor ansiedad. Por lo que la ansiedad puede tornarse en autogeneradora, ya que los síntomas refuerzan la reacción, lo que origina una escalada. (27)

Algunos síntomas menos específicos pero frecuentes en la consulta y que suelen tener relación con problemas ansiosos y que usualmente están acompañados de una percepción egodistónica (percibidos como no aceptables a pesar de ser conscientes) son el deseo de permanecer en casa ya que se sabe que es un lugar seguro, el temor a comer en público o con personas desconocidas, etc. (56)

#### 1.1.4 DIAGNÓSTICO

### FLUJOGRAMA PARA EL DIAGNOSTICO CLÍNICO DE LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD



FUENTE: DIAGNOSTICO ANSIEDAD.

<http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>

FIGURA 2. DIAGNOSTICO

## 1.1.5 BASES BIOLÓGICAS DE LA ANSIEDAD

### 1.1.5.1 Fisiología del sistema nervioso central

La psicofarmacología actual se basa en la neurotransmisión química. Para entender los trastornos del Sistema Nervioso Central (SCN) y la acción de los fármacos que tratan de mejorar esos trastornos, es necesario hacer un repaso de la fisiología de SNC y los principios de la neurotransmisión. (7)

El cerebro tiene más de  $10^{11}$  neuronas, aunque lo que determina su tamaño no es el número de neuronas, sino el crecimiento de estas. Gracias al aumento del número de axones y dendritas, el cerebro llega cuatro veces mayor en el adulto que en el recién nacido.

El cerebro culmina su capacidad de desarrollo cuando establece asociaciones entre distintas áreas cerebrales, según lo requiera el entorno, esto es, según la necesidad de adaptación. (1)

El SNC se representa con una serie de neuronas, que se conectan por axones. Los impulsos nerviosos que se envían y reciben no saltan directamente de unas neuronas a otras, sino que lo hace a través de un neurotransmisor que lanza la neurona presináptica y que se une al receptor de la neurona postsináptica. Por lo tanto el impulso eléctrico se convierte en señal química en la sinapsis, y vuelve a convertirse en impulso eléctrico que desencadena respuestas bioquímicas en la segunda neurona. (7)

Tanto las enzimas como los receptores, son moléculas de proteínas que se sintetizan en el núcleo de la neurona y son transportadas hasta el terminal del axón. Las enzimas tienen distintas funciones como la fabricación y destrucción de neurotransmisores. A su vez, los receptores se encargan de capturar y reaccionar con los neurotransmisores de la sinapsis. (9)

Por lo tanto, la neurotransmisión consiste en el siguiente proceso: el neurotransmisor es almacenado en vesículas en la neurona presináptica. Al llegar un impulso eléctrico el neurotransmisor se dispara, atravesando la sinapsis, buscando y uniéndose en el lugar diana del receptor selectivo que se sitúa en la neurona postsináptica. Esto inicia el proceso que desemboca en un nuevo impulso eléctrico y en sus correspondientes respuestas bioquímicas. (7)

Así es como el cerebro hace sus trabajos (pensar, recordar, controlar movimientos), por medio de las descargas eléctricas de las neuronas cerebrales y la síntesis de distintas sustancias gracias al proceso de neurotransmisión (30).

Las enfermedades mentales afectan a las distintas fases de la neurotransmisión, y los

fármacos que actúan sobre el SNC, incluidos la cafeína, alcohol, drogas de abuso y nicotina, lo hacen sobre los distintos componentes de este proceso (1).

Por tanto, tres de los elementos más importantes de la neurotransmisión son los neurotransmisores, los receptores y las enzimas:

1. La misión de los neurotransmisores es salir “disparado” desde el axón de la neurona presináptica, busca impactar en el lugar diana del receptor específico. Actúa como una llave que encaja en la cerradura receptora, para conseguir transmitir el impulso eléctrico.

Una vez liberados los neurotransmisores en la sinapsis, pueden seguir distintos caminos:

- ♣ Unirse al sitio específico del receptor de la neurona postsináptica.
  - ♣ Sufrir una recaptación hacia la neurona presináptica por medio de un transportador “bomba receptadora”, después de haberse unido a su receptor y haber participado en la neurotransmisión. Este es un sistema de reutilización de los neurotransmisores.
  - ♣ Reincorporarse a la neurona presináptica al ser degradado, convertido en metabolito inactivo, por una enzima como la monoaminoxidasa (MAO).
  - ♣ Ser metabolizado, y por tanto destruido, por una enzima como la catecol-O-metiltransferasa (COMT) en la sinapsis.
2. Actualmente se da mucha importancia a la interacción selectiva entre el único sitio de unión del neurotransmisor y los receptores, ya que ésta es la forma en que la información es codificada y decodificada. De la misma manera que se ha dicho que es posible que varíen las cantidades de producción de neurotransmisor también puede ocurrir que se modifiquen las tasas de síntesis de receptores, con lo que se consigue modificar la sensibilidad de la sinapsis. Cuando una sinapsis se usa demasiado, es decir cuando hay una hiperactividad por exceso de neurotransmisor, se disminuye la producción de receptor, de manera que al haber menos receptores en los terminales se produce una

menor tasa de neurotransmisión. Este efecto se denomina regulación a la baja (downregulation) (7).

Por el contrario cuando la actividad es insuficiente, por falta de neurotransmisor, se aumenta la sensibilidad de la sinapsis aumentando la síntesis de receptor, de forma que se incrementa la neurotransmisión. Este efecto se denomina regulación al alza (up regulation). Estos mecanismos de regulación de la sensibilidad sináptica permiten que cada circuito neuronal cerebral funcione correctamente. Si la sensibilidad de algún circuito fuera anormalmente alta aparecerían continuamente calambres, convulsiones, trastornos psicóticos y mentales. Esta alteración es la que se sospecha en algunos trastornos mentales como veremos a continuación (7).

3. Por último la función de las enzimas es convertir el precursor del neurotransmisor en la molécula de neurotransmisor activa y una vez que éste ha actuado en el receptor se une a él para destruirlo. Se trata de una unión muy selectiva. La variación en los niveles de enzimas afecta a la cantidad disponible de neurotransmisor y por tanto a la neurotransmisión (7).

#### **1.1.5.2 Neurotransmisores en la respuesta de ansiedad**

Los neurotransmisores son productos de síntesis de la neurona que al ser liberados ejercen su acción específica sobre el receptor específico. Los receptores específicos se encuentran localizados en la membrana neuronal y pueden ubicarse tanto en otra neurona como en la propia neurona que los sintetiza.

Por otra parte, tendríamos que señalar que son varios los circuitos sinápticos implicados, que incluyen los Sistemas de Noradrenalina, Serotonina, Dopamina y Ácido Gamma Amino Butírico (GABA) fundamentalmente, aunque existen otros neurotransmisores implicados directa o indirectamente en la manifestación de ansiedad.

##### **a) Noradrenalina**

Es un neurotransmisor que se secreta fundamentalmente en el locus ceruleus. La Noradrenalina o Norepinefrina es una catecolamina cuyo precursor es la Tirosina que por acción de la enzima Tirosina-Hidroxilasa produce Dopa, la cual, por acción de la enzima Dopa-descarboxilasa, produce otro neurotransmisor que es la Dopamina, esta última origina la Noradrenalina por medio de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa en las vesículas presinápticas. Participa en el control sueño - vigilia, en la disminución de la agresividad, la buena memoria y aprendizaje, además regula el humor y la conciencia, aumentando el estado de alerta. Se dan niveles alterados de noradrenalina en la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, manía, depresión y ansiedad. (11)(50)

#### **b) Serotonina**

Químicamente se trata de la indolalquilaminina 5-hidroxitriptamina (5HT), que en la década de los cuarenta se aisló por primera vez. Es una sustancia que ya se conocía por su efecto tonificador de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos. Al ser aislada del suero (Serum) se unieron ambos conceptos para darle el nombre con la cual la conocemos: Serotonina.

Participa en el control del sueño y vigilia, en la exaltación del ánimo, contribuye a la disminución de la sensibilidad al dolor, a la regulación del apetito y del estado afectivo.

Este neurotransmisor se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano la hidroxilasa capta un radical -OH y se produce el 5-hidroxitriptófano, al descarboxilarse por medio de la enzima dopadescarboxilasa, se convierte en Serotonina. Este neurotransmisor se sintetiza en la neurona, tanto en el núcleo como en las terminaciones. La biodegradación de la Serotonina se produce tanto intracelularmente como en la hendidura sináptica, por medio de la enzima Mono Amino Oxidasa (MAO), dando origen a su metabolito principal, el ácido 5-hidroxi-indolacético.

Participa en el control del sueño y vigilia, en la exaltación del ánimo, contribuye a la disminución de la sensibilidad al dolor, a la regulación del apetito y del estado afectivo. (12) (50)

Muchas de las áreas inervadas por vía serotoninérgica, forman parte del Sistema Límbico, lo que lleva a la serotonina a verse implicada en la expresión de las emociones.

La Serotonina participa en el control hipotalámico sobre las secreciones de la hipófisis, entre otras, la adenocorticotropina (ACTH) que en situaciones de ansiedad se encuentra incrementada y estimula la corteza adrenal para producir cortisol.

La serotonina tiene un efecto modulador general, inhibe por acción directa o por estimulación del GABA. Se encuentra relacionada con la regulación del ánimo, del sueño, con la actividad sexual, el apetito, los ritmos circadianos, las funciones neuroendocrinas, la temperatura, el dolor, la actividad motora y las funciones cognitivas. Se ha relacionado la Serotonina con los trastornos de ansiedad por actividad ansiogénica, el insomnio, la hipertermia, las náuseas, hipernoradrenergía y aumento del Cortisol plasmático.

### c) **Ácido Gamma Amino Butírico (GABA)**

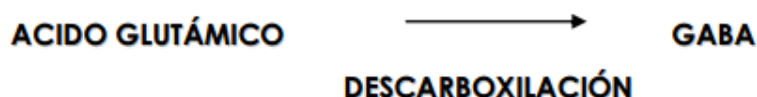
La mayoría de las neuronas cerebrales utilizan GABA al igual que Glutamato como neurotransmisor, el mismo está distribuido en todo el cerebro, aunque la mayor proporción se encuentra en el Cerebelo.

Pertenece al grupo de Aminoácidos (AA) neurotransmisores junto al ya nombrado Ácido Glutámico y también el Ácido Aspártico y la Histamina. Se sintetiza en diferentes sitios del Encéfalo, sobretodo en interneuronas inhibitorias. Las vías gabaérgicas tienen fundamentalmente un efecto de disminución de las respuestas al miedo y también en la capacidad de aprendizaje, debido principalmente a los receptores GABA presentes en la amígdala y en el hipocampo.

Se han descrito tres (3) tipos fundamentales de receptores GABA: los inotrópicos GABA-A y los metabotrópicos, GABA-B Y GABA-C.

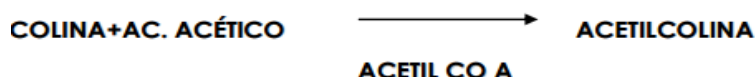
Los GABA-A abren los canales de cloro y por ello son inhibidores del impulso nervioso. Este es el receptor que situado en la membrana plasmática del terminal post-sináptico está relacionado con los receptores benzodiacepínicos (BZD).

Los receptores GABA-B y GABA-C, no tienen relación con los receptores benzodiacepínicos. (50)



#### **d) Acetilcolina**

Es otro neurotransmisor extremadamente importante y del que se hace indispensable hacer mención. Se sintetiza a partir de la unión de Colina con Ácido Acético facilitada por la enzima Acetil-Coenzima A (Acetil-Co A).



La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor específico a nivel ganglionar en el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y en las sinapsis del Sistema Nervioso Somático (SNS).

La acción de la ACh se manifiesta de forma generalizada y su alteración puede observarse en síntomas como trastornos de la atención y memoria, confusión y/o desorientación.

#### **e) Somatostatina**

Ejerce un importante papel sobre el comportamiento, reduce la actividad motora y puede actuar como inhibidor de la frecuencia de descarga neuronal en distintas áreas cerebrales. Nombraremos dos sustancias también muy importantes por su relación en la aparición y/o regulación de la respuesta de ansiedad como son:

#### **f) Neuropéptido Y**

Se ha encontrado el neuropéptido Y en el SNC, tiene intervención en la actividad endocrina al nivel hipotalámico e hipofisiario. Se han descrito varios subtipos de receptores para este péptido Y1, Y2 y Y3, siendo el Y1 el que pareciera estar implicado en actividades de control de la ansiedad.

#### **g) Colesístoquinina (CCK)**



Es también un neuropéptido que puede inducir ataques de pánico en individuos predispuestos. Como su nombre sugiere, pertenece al grupo de las quininas. Se sintetiza a partir de un péptido que en varios pasos produce diferentes tipos de CCK, tales como CCK-SU, CCK-39 y CCK-8 siendo esta última la forma como fundamentalmente se encuentra en el SNC. La CCK parece relacionada en la manifestación de emociones y se involucra en la liberación de prolactina, la hormona del crecimiento (GH) y la adenocorticotropina (ACTH).

Se han descrito dos subtipos principales para la CCK, la CCKA y la CCKB. La estimulación de ambas genera estado de ansiedad y su bloqueo tiene efectos ansiolíticos, efecto que parece estar relacionado con la alta presencia de CCK al nivel de la amígdala. También se ha demostrado que en situaciones de ansiedad o temor los valores de CCK se encuentran elevados en la amígdala. (50)

## **1.2 LA MEDICINA TRADICIONAL**

El concepto de medicina tradicional es una nominación convencional adoptada recientemente por investigadores de los procesos de salud-enfermedad para referirse a los sistemas médicos empíricos, organizados y fundamentados en las diversas culturas del mundo. Aunque existen generalidades compartidas, cada sociedad ha elaborado un sistema terapéutico complejo que engloba concepciones ideológicas y prácticas terapéuticas, al igual que el desarrollo de especialistas que saben cómo aplicarlas. (3) (46)

En todos los pueblos del mundo el proceso de salud enfermedad es una realidad concreta presente en el ciclo de vida de todos los individuos sociales. Desde siempre ha sido una preocupación básica del hombre la observación de sus padecimientos hasta llegar a elaborar complejas concepciones sobre la vida y la muerte, las enfermedades y sus tratamientos. (3) (46)

Parte importante del patrimonio cultural de cada pueblo es este desarrollo cognoscitivo, y a partir de él se han conformado sistemas médicos empíricos teniendo como base la apropiación y uso de los recursos naturales del entorno biótico. (3) (43) (49)

Estos conocimientos se han transmitido de generación en generación para preservar la vida y permitir la reproducción y florecimiento de la propia cultura. Miles de años de observación y experimentación empírica han sido necesarios para la evolución de los diversos sistemas médicos empíricos alrededor del mundo, de las concepciones que los fundamentan, así como del conocimiento de plantas, animales y minerales que constituyen los nichos ecológicos. Se han seleccionado los elementos útiles con potencialidades curativas y elaborando taxonomías y diferentes tratamientos para las necesidades de salud que afrontan las sociedades.(3) (5)

Frecuentemente se piensa que la medicina tradicional abarca sólo el manejo de medicamentos naturales o más específicamente, la curación herbolaria. Pero la medicina llamada tradicional es más que eso; es una concepción holística que ubica al individuo en su relación con otros hombres, con la naturaleza y con el universo. Tienen su propia lógica y leyes que entrelazan las percepciones del cuerpo con las del macrocosmos. La enfermedad es vista como un desequilibrio que se presenta por la falta de armonía o la infracción a las leyes reconocidas en dichas esferas. (3) (5)

Hasta ahora el campo de investigación sobre la medicina tradicional ha sido abordado principalmente por la antropología, pero cada vez mayor número de disciplinas científicas se incorporan para enriquecer el rescate y la revalorización de este patrimonio cultural que ha contribuido sustancialmente a la conservación de la salud humana, al igual que al desarrollo del conocimiento médico autóctono y de sus recursos. Las necesidades actuales de salud en el mundo y la crisis económica de muchos países como el nuestro, hacen indispensable un estudio más profundo de los recursos médicos disponibles. (5)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido la utilización de todos los recursos existentes sin discriminaciones ideológicas ni políticas reconsiderando la potencialidad, eficacia y aceptación de las medicinas tradicionales en las culturas populares. Con el objeto de contribuir a mantener la salud para todos los hombres, la OMS recomienda establecer puentes de colaboración entre los diferentes sistemas médicos. (5)

Desde fines de la década del 1970 se viene hablando (OMS/OPS) sobre la necesidad de integrar las medicinas tradicionales dentro de los sistemas oficiales para mejorar la calidad de los servicios de salud. Esto, sobre todo por razones de orden cultural y

económico (80% de la población mundial está en una situación cultural y económica que define su preferencia y dificulta su acceso a la medicina occidental). (2)

Las principales estrategias desarrolladas para lograr esta meta han sido las investigaciones de las plantas medicinales, para conseguir una validación científica de los tratamientos herbolarios, y la movilización y capacitación de los recursos humanos de la medicina tradicional para así aprovechar mejor sus propiedades en beneficio de la salud a bajos costos. (2)

## **1.2 MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA**

Es aquella rama de la medicina tradicional que utiliza plantas o partes de ellas, ya sean en su forma natural o preparada de diversa manera con la intención de curar o aliviar o prevenir diferentes síntomas o enfermedades. (2)

### **1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA**

Todo pueblo, etnia o nación tiene su medicina tradicional, así como su tradición culinaria, del vestir etc. No importa el nivel de desarrollo que posea, ni la región en que se desenvuelva, la medicina tradicional herbolaria es inherente a cada población y cultura, lo que le da características propias, que son:

1. Distribución mundial
2. Prácticas basadas en creencias
3. Uso actual vigente
4. Tradición cultural oral y escrita.
5. Transferencia de generación en generación
6. Difícil transferencia entre culturas diferentes.
7. Remedios confiables y seguros.
8. Bajo costo. (2) (46)

## **1.3 LA FITOTERAPIA**

Básicamente consiste en el uso de las plantas con fines curativos, constituyendo una de las terapias más antiguas que existen, aunque muchos intenten desprestigiarla. Pero por ejemplo para poder tener en cuenta la propia eficacia de la fitoterapia, se deben recordar que, a día de hoy, muchos de los fármacos que existen son derivados de plantas medicinales. (8)

Simplemente por este hecho no hay que menospreciar el valor medicinal de las plantas, aunque tampoco podemos pensar que por tratarse de terapias o remedios naturales, carecen de cierta toxicidad, en especial porque contienen principios activos que pueden provocar efectos indeseables si no son usadas de forma correcta. (8) (31)

Muchos de los preparados a base de hierbas o plantas medicinales en sí pueden llegar a resultar una buena solución para pequeños problemas de salud. Si no se tienen unos conocimientos adecuados, es informarse lo mayor posible de las propiedades, beneficios y virtudes de aquella planta que vayamos a utilizar, pero teniendo siempre en cuenta las dosis correctas para que sólo obtengamos de las mismas las propiedades que deseamos. (13) (17)

La OMS (1978) define dichos conceptos:

1. **Planta medicinal:** Todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semi-síntesis químico - farmacéutica. (13)
2. **Fitofármaco:** Es el extracto estandarizado de una parte de la planta medicinal utilizado en terapéutica. La estandarización se realiza considerando alguno de los compuestos bioactivos. (13)
3. **Principios activos:** Son las sustancias responsables de la acción farmacológica.

La fitoterapia utiliza por tanto, fitofármacos y principios activos aislados de las plantas. Estos productos deberán ser convenientemente preparados, dándoles la forma farmacéutica más adecuada para su administración al paciente. (13)

#### 1.4.1 LA FITOFARMACOLOGÍA

Es la rama de la farmacología que se orienta al estudio de los extractos de plantas medicinales o fitofármacos. Se requieren investigadores imaginativos, no dogmáticos, dispuestos a no dejarse anclar por comodidad a un exclusivo modelo experimental. Este tipo de investigador farmacólogo debe procurar mantener una visión holística para poder descifrar los mecanismos de acción subyacentes a los diversos compuestos contenidos en los extractos en especial de los compuestos bioactivos que pueden interactuar con múltiples sitios en el organismo. (13)

## **1.5 FORMAS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS**

### **1.5.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Los principales activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas o bien pueden ser administrados como tales, en la planta desecada o en la planta fresca. (41)

A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear, de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. (44)

Cuando utilizamos el agua como vehículo extractivo reciben el nombre genérico de Tisanas, que son preparaciones acuosas en las que se aprovecha el poder de extracción que el agua posee. Manteniendo el agua en contacto con la planta ésta cede parte de sus principios activos a la misma, aquellas sustancias que son solubles en agua. Ocurre un fenómeno de difusión celular. Una vez que la planta ha sido embebida, es decir, impregna de agua, vuelve a reconstruir el estado que tenía la planta fresca. En la planta seca los protoplasmas celulares están retraídos hacia las paredes celulósicas de rigidez indeformable, con lo cual se llenan de finas películas de aire, el cual es expulsado por el fenómeno de la imbibición y sustituido por agua. La difusión celular y por tanto la extracción de principios activos durará mientras no se alcance un equilibrio osmótico entre protoplasma celular y líquido extractivo, en este caso agua. (22) (40)

Entre los métodos más utilizados son:

**a) Maceración**

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.

**b) Percolación o Lixiviación**

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto. (4)

**1.6 GRANADILLA (*Passifloraligularis*)**



**FOTOGRAFÍA 1. GRANADILLA (*Passifloraligularis*)**

**1.6.1 DIVISION TAXONOMICA**

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Violales*

**Familia:** *Passifloraceae*

**Género:** *Passiflora*

**Especie:** *P. ligularis* (23)

### 1.6.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

La Granadilla (*Passifloraligularis*), perteneciente a la familia *Passifloraceae* es una planta trepadora originaria de las montañas de los Andes entre Bolivia, Perú y Ecuador. En la actualidad se cultiva desde el norte de Argentina hasta México y en zonas tropicales de África y Australia.

Es una planta que prospera bien en zonas de clima frío moderado que presente temperaturas entre los 14 y los 24°C y una humedad relativa de un 75%, siendo intolerante al calor fuerte. Requiere de suelos profundos y fértiles con buena aireación, textura franca o franco arenoso, con buen contenido de materia orgánica y un pH entre 6 y 6.5. (36)

### 1.6.3 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

#### **a) Raíz**

La especie *ligularis* presenta raíces fibrosas, fasciculadas y poco profundas, con una raíz primaria de escaso crecimiento, de la que se derivan un gran número de raíces secundarias. Las raíces se suelen distribuir en los primeros 50 cm de suelo, encontrándose la mayor densidad en los primeros 30 cm.

#### **b) Tallo**

Es cilíndrico, estriado y voluble, dando soporte a la planta y con la misión de almacenar agua. El tallo y las ramas presentan nudos cada 12 a 15 cm y en cada nudo se identifican 7 estructuras: una hoja; dos brácteas o estipulas; dos yemas florales al interior de las brácteas o estipulas; y un zarcillo. La función de las brácteas o estipulas es proteger las dos yemas florales. El zarcillo, estructura filamentosa en forma de espiral, tiene como función ayudar a la planta a trepar y enredarse.

#### **c) Hojas**

Son grandes, 8-20 cm de largo y 6,5 cm de ancho, gruesos, acorazonados y de color verde intenso. El borde de las hojas es liso y son enteras, alternas y con las nervaduras bien pronunciadas en el envés, se insertan en el tallo mediante un peciolo largo y grueso que contiene tres pares de glándulas de 1 cm, aproximadamente, llamadas lígulas. Hacia las axilas de las hojas crecen estípulas pareadas, oblongo-lanceoladas.

#### **d) Flores**

Miden de 6 a 8 cm de diámetro, con sépalos y pétalos de color blanco y amarillento y la corona con bandas alternas moradas y blancas, empieza a dar fruto entre 1 y 3 años. La maduración del fruto comienza entre 70 y 80 días después de la polinización.

#### **e) Fruto**

Es una cápsula ovoide o elíptica, sostenida por un pedúnculo largo que tiene dos brácteas y que mide de 6 a 12 cm de largo. La cascara del fruto es dura, amarilla con puntos blancos y con seis líneas del ápice a la base, de color variable en función del grado de madurez.

El epicarpio está formado por varias capas de células cortas y de paredes muy gruesas y amarillas y, aunque miden menos de 1mm de espesor, le dan una gran solidez a la fruta. El epicarpio duro y el mesocarpio seco favorecen el almacenamiento y transporte de la granadilla.

#### **f) Semillas**

Se agrupan en tres placentas longitudinales situadas en las paredes. Las semillas son planas, elípticas, negras y rodeadas de un arilo transparente y gelatinoso que se constituye en la parte comestible.

Este arilo se compone de un parénquima que contiene azúcares y principios ácidos que determinan un sabor final dulce y muy agradable.

La granadilla es una planta trepadora que suele trepar por los árboles bajos o troncos muertos, en donde llega a enredarse completamente. (36)



#### 1.6.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Su composición química se caracteriza por tener Vitamina C, Hierro, carotenos, vitamina B, Calcio, Magnesio, y Fósforo; por lo que es un gran preventivo, ya que fortalece el sistema inmunológico contra enfermedades respiratorias. Y por ser de la familia de las *Passifloras*, tiene un efecto suave en las alteraciones nerviosas como la ansiedad. (45)

<b>COMPOSICION DE LA PULPA MADURA (por 100 gr.)</b>		
	<b>Variedad morada</b>	<b>Variedad amarilla</b>
Agua:	85.6 %	84.9 %
Calorías:	51	53
Azúcares:	13.6%	13.7%
Proteína:	12.5 mg	24.6 mg
Calcio:	3.6 mg	3.8 mg
Hierro:	0.2 mg	0.4 mg
Vitamina A:	717U.I.	2410 U.I.
Vitamina B2:	0.10 mg	0.10 mg
Vitamina C:	30 mg	20 mgs.

FUENTE: [http://ocw.upm.es/botanica/plantas-de-interes-agroalimentario/Temas\\_pdf\\_revisado/tema-9-frutos-de-zonas-subtropicales-ii](http://ocw.upm.es/botanica/plantas-de-interes-agroalimentario/Temas_pdf_revisado/tema-9-frutos-de-zonas-subtropicales-ii)

**FIGURA3. COMPOSICIÓN QUÍMICA GRANADILLA (*Passifloraligularis*)**

#### 1.6.5 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Entre sus usos destacan sus propiedades sedantes para las enfermedades nerviosas o a modo de relajante y también a modo calmante, para los nervios y contra el estrés, puede ser más interesante incluso que la conocida tila.

Es bueno para las afecciones del aparato circulatorio y la hipertensión arterial, lo que la convierte en útil para tu corazón. También es buena para el asma espasmódica, la ansiedad, el insomnio, migraña, fatiga, taquicardia, vértigo y muchas más.

La *Passiflora* utilizada sobre todo en cuestiones del sistema nervioso o molestias psicológicas y puede ser una buena herramienta para luchar contra el síndrome de la

abstinencia de dejar alguna sustancia nociva que crea adicción. Como antiespasmódico, la *Passiflora* sirve para tratar y reducir los dolores ocasionados por cólicos intestinales, así como también para tratar casos de diarrea.

Popular e históricamente se ha utilizado la *Passiflora* de manera externa, para curar las heridas mediante la aplicación de cataplasmas. (53) (54)

#### 1.6.6 PRINCIPIOS ACTIVOS

La parte aérea de la planta contiene los principios activos que ejercen una actividad ansiolítica.

Las flores son muy vistosas y están sobre un pedículo axilar. Presenta 5 sépalos rugosos.

Los pétalos son de blancos a rojo pálidos.

Contiene trazas de alcaloides indólicos (harmano, harmina y harmol), derivados de apirona (maltol y etilmaltol), derivados flavónicos (quercetol, kaepherol, apigenol, luteolol), c-flavonoides (crisina, vitexina, isovitexina, orientina, saponaria, flavononas), cumarinas, ácidos fenólicos y trazas de aceite esencial.

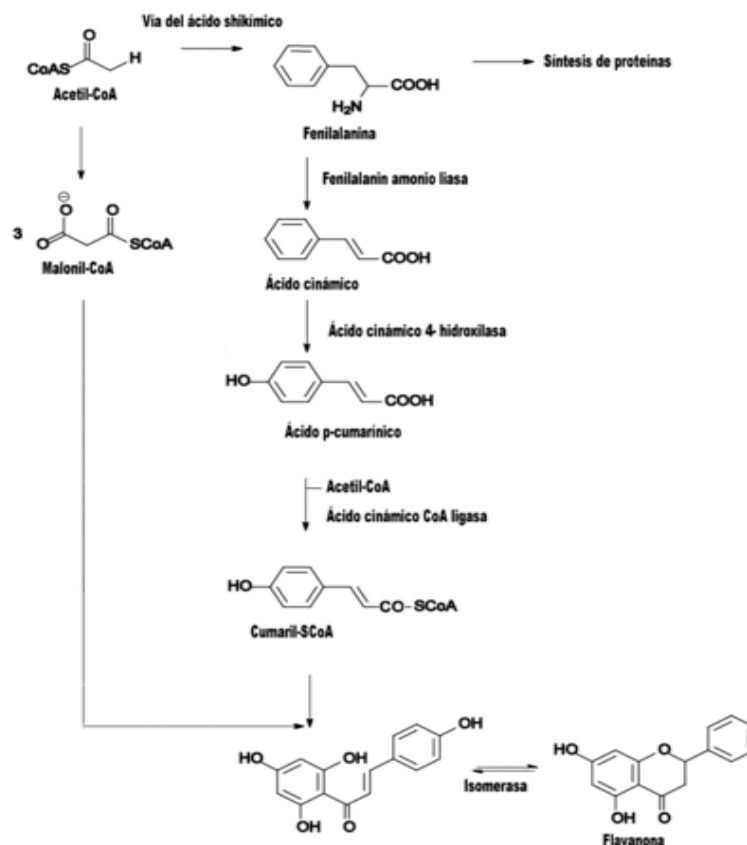
Los presuntos responsables de este efecto ansiolítico son los alcaloides indólicos y el flavonoide crisina. (36)

##### 1.6.6.1 Flavonoides

Flavonoide es el término genérico con que se identifica a compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C6-C3-C6, esto es un anillo bencénico unido a una cadena, propionica y esta a su vez a otro anillo bencénico. (6) (28) (32)

Son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos, generalmente encontrados como aglicona y /o glicósidos, se hallan presentes en todas las partes de las plantas, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. (10)

### 1.6.6.1.1 Biosíntesis



FUENTE: FLAVONOIDE. <http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide>. 2011-05-02

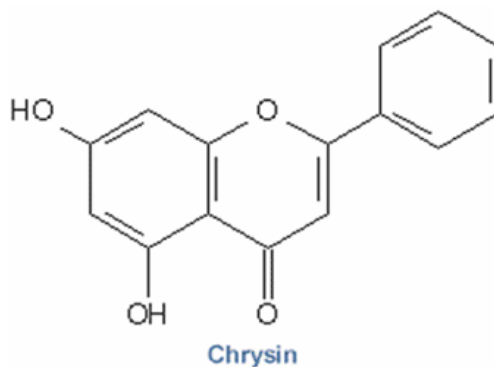
**FIGURA 4. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES EN LAS PLANTAS**

La vía del ácido shikímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina.(32)

La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoAligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el

precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides. (32)

#### 1.6.6.1.2 Crisina



FUENTE::<http://www.google.com.ec/imgres?q=chrysin&um=1&hl=es&biw=1366&bih=677&tbn=isch&tbnid=LUufXhIWQBjqWM:&imgrefurl=http://www.itmonline.org/arts/oroxylum.htm&docid>

**FIGURA5. FÓRMULA MOLECULAR DE LA CRISINA**

La crisina es un flavonoide que se encuentra en algunas plantas como la *Matricaria chamomillayen* la familia *Passifloracea*. En la medicina tradicional estas plantas se emplean desde tiempos remotos como sedantes y ansiolíticos naturales. Los estudios sistemáticos actuales han identificado la presencia de flavonoides como la crisina, los cuales tienen afinidad por el receptor GABAA, por lo cual modulan la actividad de los canales de Cl<sup>-</sup> en las neuronas ejerciendo así algunos efectos ansiolíticos (Medina et al., 1990; Zanolli et al., 2000; Rabbani et al., 2004)

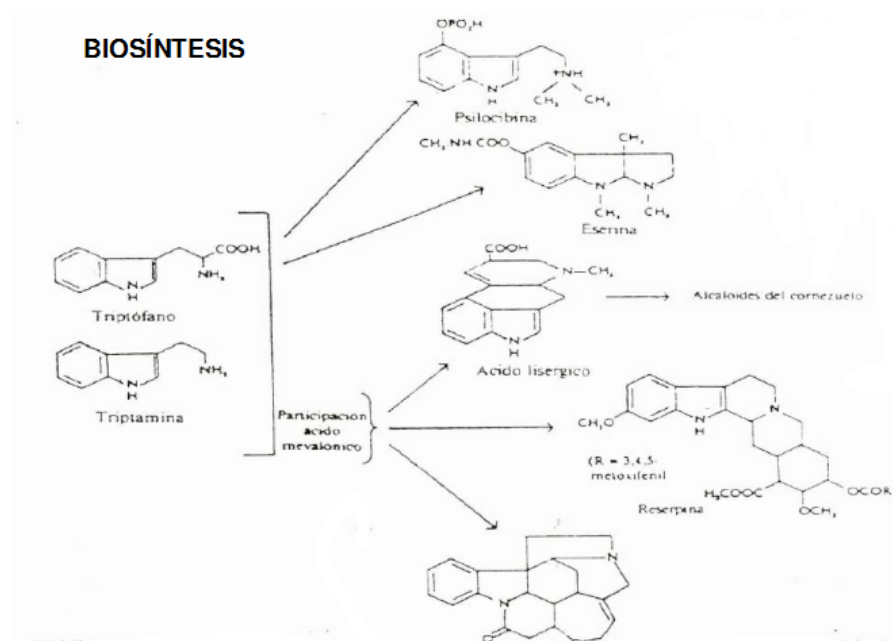
Por otra parte, algunos estudios revelan que la crisina, en comparación con el diazepam, no ejerce efectos amnésicos sobre la adquisición o retención de tres diferentes conductas aprendidas en las ratas, aún en dosis altas (Salgueiro et al., 1997). (20)

#### 1.6.6.2 Alcaloides

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos, poseen significativa actividad farmacológica como: antiespasmódico, anestésico local, sedante, analgésico, hipnótico, emético, expectorante, antipirético, amebicida, estimulante cardíaco, diurético, midriático, narcótico, tónico,

emenagogo, antiséptico, vasoconstrictor, relajante muscular, antitumoral, hipotensoras.  
(10)

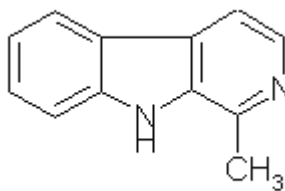
#### 1.6.6.2.1 Biosíntesis



FUENTE::<http://es.scribd.com/doc/91873278/ALCALOIDE>

**FIGURA6.BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES INDÓLICOS**

#### 1.6.6.2.2Harmano



FUENTE::[http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.extrasynthese.com/catalogue/alkaloids\\_and\\_derivatives/harman,r21,p11753](http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.extrasynthese.com/catalogue/alkaloids_and_derivatives/harman,r21,p11753)

**FIGURA7. FÓRMULA MOLECULAR DEL HARMANO**

Alcaloides Harmano se describe en el género *Passiflora* en la década de 1950, y su biosíntesis de L-triptófano se ha propuesto (Slaytor y McFarlane, 1968). En la década de

1970 y anteriores, analítica obras realizadas con técnicas menos sensibles se encuentran cantidades apreciables de alcaloides en el género *Passiflora*. (37)

Tienen actividad sedante o hipnótica tienen, interactuar con una variedad de sistemas de neurorreceptores, y son inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO) enzima. (33)

### **1.7 DIAZEPAM**

Diazepam es un fármaco que facilita la unión del ácido gamma-amino-butírico (GABA) con su receptor. El GABA es un neurotransmisor inhibidor que se encuentra en el cerebro. El diazepam aumenta la actividad de GABA, reduciendo el funcionamiento de ciertas áreas del cerebro.

Produce somnolencia, un descenso en la ansiedad y relajación de los músculos. (25)

El Diazepam se creó para ayudar a la gente a relajarse y deshacerse de los sentimientos de ansiedad y nerviosismo, ya sea si estos sentimientos se producen todo el tiempo o si son desencadenados por ciertos acontecimientos, emociones o recuerdos. El Diazepam se usa para tratar a las personas con trastornos como la fobia social, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo-compulsivo, síndrome de estrés postraumático, ataques de pánico y otros trastornos de fobia que pueden paralizar a una persona con ansiedad. (39)

#### **1.7.1 CONTRAINDICACIONES**

Si es alérgico (hipersensible) a este principio activo, a otras benzodiazepinas o a cualquiera de los demás componentes de la especialidad farmacéutica que le han recetado.

Los síntomas de alergia pueden incluir:

- ♣ Crisis de asma, con dificultad respiratoria, respiración con silbidos audibles o respiración rápida.
- ♣ Hinchazón más o menos brusca de cara, labios, lengua u otro lugar del cuerpo. Es especialmente crítica si afecta a las cuerdas vocales.
- ♣ Urticaria, picor, erupción cutánea

- ♣ Shock anafiláctico (Pérdida de conocimiento, palidez, sudoración, etc.).

Tampoco debe tomar este medicamento

- ♣ Si sufre problemas musculares o hepáticos graves
- ♣ Si padece dificultades respiratorias relacionadas o no con el sueño desde hace tiempo.
- ♣ Si usted sufre dependencias a drogas o a alcohol, no debe tomar diazepam a menos que su médico se lo indique formalmente. (26)

### 1.7.2 DURACIÓN DEL TRATAMIENTO

Deberá tomar este medicamento durante el menor tiempo posible, incluyendo el tiempo necesario para dejar de tomarlo de forma gradual.

Al comienzo del tratamiento usted tomará este medicamento durante un periodo de tiempo limitado, se disminuir la dosis del medicamento de forma progresiva. Además es importante que Ud. sea consciente de la posibilidad de aparición de un fenómeno de rebote, lo que disminuirá su ansiedad ante los síntomas que pueden aparecer al suprimir la medicación. (26)

### 1.7.3 EFECTOS SECUNDARIOS

Al igual que todos los medicamentos, diazepam puede tener efectos adversos, aunque no todas las personas los sufran.

La mayoría de los pacientes toleran bien diazepam, pero algunos, especialmente al principio del tratamiento se encuentran algo cansados o somnolientos durante el día.

Otras reacciones adversas tales como alteraciones gastrointestinales, cambios en la libido o reacciones cutáneas pueden ocurrir ocasionalmente.

Puede desarrollarse una amnesia anterógrada, es decir que no recuerde lo sucedido mientras estuvo levantado después de tomar el medicamento, por lo tanto deberá asegurarse que podrá descansar por lo menos durante 7 horas sin ser molestado.

Muy raramente, este medicamento puede producir ansiedad repentina, alucinaciones, excitación, trastornos del sueño, reducción del estado de alerta, confusión, fatiga, cefalea, mareo, debilidad muscular, ataxia o diplopía, depresión, reacciones psiquiátricas y paradójicas. (26) (65)

#### 1.7.4 MECANISMO DE ACCIÓN

Las benzodiazepinas actúan sobre el sistema límbico, talámico e hipotalámico del sistema nervioso central produciendo sedación, hipnosis, relajación muscular al mismo tiempo que ejercen una actividad anticonvulsiva. Las benzodiazepinas ejercen su acción estimulando el complejo receptor para ácido gamma-aminobutírico (GABA) benzodiazepina. El GABA es un neurotransmisor inhibitorio que ejerce sus efectos en los subtipos de receptores GABA denominados GABA-A y GABA-B. El GABA-A es el subreceptor primario en el SNC y está implicado en los efectos de los ansiolíticos y sedantes, habiéndose identificado tres subtipos de receptores benzodiazepínicos (BNZ) acoplados al mismo: el BNZ-1 se localiza en cerebelo y en la corteza cerebral; el BNZ-2 se encuentra también en la corteza cerebral y en la médula espinal, mientras que el BNZ-3 se encuentra en los tejidos periféricos. La activación del BNZ-1 induce el sueño, mientras que el BNZ-2 se encuentra implicado en la relajación muscular, actividad anticonvulsivante, coordinación motora y memoria. Al unirse a los receptores BNZ, las benzodiazepinas estimulan, de forma indirecta, el GABA.

La unión del GABA a su receptor, abre el canal de cloro lo que origina una hiperpolarización de la membrana celular que impide su posterior excitación. La acción ansiolítica de las benzodiazepinas se explica por su capacidad de bloquear el despertar cortical y límbico que sigue a una estimulación de las vías reticulares. Finalmente, los efectos relajantes musculares se deben a una inhibición mono y polisináptica en las vías neuromusculares, aunque también tienen un efecto directo depresor sobre el músculo y el nervio motor.

Las benzodiazepinas aumentan la inhibición pre-sináptica de las neuronas, limitando la dispersión de la actividad eléctrica y reduciendo la posibilidad de convulsiones aunque no inhiben las descargas focales anormales.(24)

#### 1.7.5 FARMACOCINÉTICA



Las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de las BZ influyen mucho sobre su utilidad clínica.

Todas las BZ son bases orgánicas débiles, son muy liposolubles y se absorben rápido y completamente por vía oral, salvo el clorazepato que es una prodroga y se descarboxila rápidamente en el jugo gástrico a N-desmetildiazepam (o nordiazepam) y luego se absorbe por completo. El midazolam es el compuesto más liposoluble y el flumazenil el menos liposoluble. La absorción por vía i.m. es irregular, en caso de ser necesaria la vía parenteral, la de elección es la i.v. generalmente, el solvente que poseen es el polietilenglicol, es un polialcohol muy irritante que hace precipitar la BZ en el tejido muscular y por lo tanto se absorbe mal la droga. En caso de elegirse la vía i.m., el músculo que se prefiere es el deltoides y la inyección debe ser profunda para evitar pérdida de biodisponibilidad en el tejido adiposo. El lorazepam es la única BZ que se absorbe completamente por vía i.m.

Cuando se administran por vía oral a los 30min. aparecen los efectos ansiolíticos o 14hipnóticos. Como vimos, son muy lipofílicas, el comienzo de acción después de una dosis oral refleja el grado de absorción gastrointestinal (aproximadamente 30 min.); la duración de acción demuestra el porcentaje de distribución en tejidos periféricos, el grado de unión a proteínas plasmáticas y el porcentaje de clearance y eliminación.

Las BZ son transportadas por la circulación sistémica a la circulación cerebral capilar, estos agentes tienen alto grado de unión a proteínas plasmáticas 80-95%, albúmina principalmente y debido a su escasa fracción libre pasan poco al líquido cefalorraquídeo.

La BZ más soluble es el diazepam, es por ello que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, realiza un rápido equilibrio entre la sangre y el tejido cerebral y se concentra en este último.

Otras BZ menos liposolubles como el lorazepam difunden con menor extensión y rapidez al cerebro, aunque finalmente (aprox.30 min.) se logra el equilibrio entre la sangre y el cerebro. Como sabemos, solo la fracción libre es farmacológicamente activa y es la que difunde a través de las membranas biológicas. La alta unión a proteínas plasmáticas también influye en la cantidad de droga captada por el cerebro, así la concentración de droga libre en plasma refleja la concentración cerebral.

El volumen de distribución aparente es amplio (1-2 L/kg), debido a que estas drogas luego de concentrarse en el cerebro sufren una redistribución tisular periférica sobre todo en lípidos y músculo.

En general las BZ son metabolizadas primariamente por enzimas microsomales hepáticas, sufriendo oxidación microsomal (fase I) y luego glucuronoconjugación (fase II). A diferencia de los barbitúricos no son potentes inductores enzimáticos hepáticos. La mayoría de las BZ deben ser primero oxidadas (metabolitos activos, fase I) y luego conjugadas (metabolitos inactivos, fase II).

Los metabolitos oxidados son activos y pueden ligarse o unirse al receptor de BZ (aunque en general poseen menos actividad que la droga madre).

Los metabolitos glucuronoconjugados son inactivos y se excretan con facilidad.

Los ancianos tienen disminuidos: la masa hepática, el flujo hepático, la oxidación, la reducción y la hidrólisis; esto hace que la fase I se demore y se acumulen droga activa y metabolitos activos. De este modo aumentan los niveles plasmáticos de la BZ y por lo tanto aumentan los efectos adversos. La glucuronación, sulfatación y acetilación no están afectadas en ancianos (fase II).

Otros agentes de vida media más larga producen metabolitos que circulan por más de 200 horas en plasma como el metabolito N-desmetildiazepam, o el metabolito oxazepam que circula en plasma 24 hs. Cuando se utilizan drogas de vida media más larga, las dosis repetidas se acumulan pudiendo producir sedación matinal, pero no aparece el insomnio rebote.

El triazolam (Halción) que es un agente de vida media corta, no produce metabolitos activos, esto podría asociarse al insomnio rebote, con ansiedad, agitación, amnesia, disturbios afectivos, sonambulismo cuando son retirados bruscamente. Esto sería un síndrome de abstinencia severo y de rápida instalación.

La oxidación de las BZ podría estar comprometida en ancianos o en hepatopatías, trayendo como consecuencia acumulación de BZ y sus metabolitos y prolongación de la vida media. Lo mismo puede ocurrir con la administración conjunta con cimetidina, estrógenos, disulfiram, eritromicina, isoniácida que compiten con las mismas enzimas microsomales para la biotransformación, pudiendo acumular las BZ.

En pacientes con cirrosis, enfermedad hepática avanzada, ancianos o pacientes tratados con otras drogas, no se afecta la actividad enzimática conjugativa. En estos casos

especiales se puede administrar oxazepam (Nesontil), temazepam (Lenal) o lorazepam (Trapax), los cuales son metabolizados exclusivamente por conjugación, teniendo especial cuidado con el lorazepam, sobre todo en ancianos por la alta incidencia de amnesia y confusión mental que produce. Podemos decir que las BZ de acción intermedia y prolongada son más susceptibles de acumulación y son las que necesitan mayores ajustes de las dosis y/o intervalos entre las mismas en hepáticos y ancianos.

Las BZ atraviesan con facilidad la placenta y son capaces de producir efectos depresores en el feto y/o teratogenicidad del comportamiento. (30)

### 1.8 *Mus musculus*



FUENTE: PALLON. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.

**FOTOGRAFÍA 2. *Musmusculus***

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva.

#### 1.8.1 EL ANIMAL DE LABORATORIO

El animal de laboratorio es aquel que:

- ♣ Es engendrado y producido en condiciones controladas.
- ♣ Mantenido en un entorno controlado.
- ♣ Posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos.
- ♣ Existe una comprobación sistemática de estos antecedentes.

También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono etc.

#### 1.8.2 EL RATÓN, SU TAXONOMÍA Y USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO

##### **TAXONOMÍA**

**Clase:** *Mamalia*

**Orden:** *Rodentia*

**Familia:** *Muridae*

**Género:** *Mus*

**Especie:** *musculus*

#### 1.8.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE SU USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO

##### **VENTAJAS**

- ♣ De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- ♣ Bajos costo de manutención.
- ♣ Cepa definida.
- ♣ Diversidad de características específicas que sirven como modelo.
- ♣ Eficiencia reproductiva.
- ♣ Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- ♣ Corto tiempo de generación.

##### **DESVENTAJAS**

- ♣ Dificultad en la recolección de material biológico.

- ♣ Dificultad la administración de drogas.
- ♣ Dificultad en las técnicas quirúrgicas. (35)

#### 1.8.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL RATÓN

El ratón doméstico es una especie cosmopolita, se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general, las especies prefieren ambientes más secos que húmedos.

El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos, es por ello que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan.

Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social. (35)

Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores. En la órbita del ojo posee unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina.

El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente, son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes.

Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología. (35)

El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30 g. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas.

#### 1.8.5 COMPORTAMIENTO DEL RATÓN

El ratón es un animal sociable y se mantiene en grupos sin ningún inconveniente, estos grupos deben formarse rápidamente luego del destete.

Sin embargo, los machos de algunas cepas comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan establecido al destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas.

El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el periodo de oscuridad. El mayor consumo de agua es durante las horas de oscuridad. El consumo de alimento y agua varía entre las cepas de ratones. (35)

El ratón generalmente divide su caja en áreas específicas para dormir, comer, orinar y defecar.

Las hembras parturientas construyen un nido y permanecen mucho tiempo cerca de él o sobre las crías.

#### 1.8.6 SISTEMA REPRODUCTIVO

La hembra es poliéstrica continua. Tras el parto, a las 14 - 28 horas se produce un estro fértil, por lo que puede utilizarse el estro posparto. Hay que tener en cuenta que la lactancia y gestación simultáneas puede retrasar entre tres a cinco días la implantación del embrión.

Al nacer el ratón pesa entre uno y dos gramos, nacen con los ojos y oídos cerrados, sin pelos y son muy activos. Al tercer día comienza a observarse el desarrollo del pelaje, llegando a cubrirse totalmente desde los siete a diez días. A los 12 días empiezan abrir los ojos y el conducto auditivo externo, entre los días 13 y 14 inician a ingerir alimento sólido y agua del bebedero. (35)

Generalmente se les desteta a los 21 días de edad con un peso de aproximadamente 11 a 14 gramos. Cuando no se ha utilizado el estro posparto, empiezan a ciclar a los cinco días postdestete. El ciclo estral tiene una duración de cuatro a cinco días, en tanto que el celo dura 12 horas.

Las hembras reproductoras pueden convivir en apareamientos monogámicos o poligámicos (de harén). Los apareamientos monogámicos consisten en el aislamiento de un macho y una hembra a lo largo de su vida reproductiva, equivalente a un año o a una

cantidad de partos que oscila entre los cinco y los ocho. La pareja de reproductores va a permanecer junta procreando, con un promedio de ocho a diez crías por camada.

En el caso de los apareamientos poligámicos, un macho es confinado junto con un número superior de hembras para incrementar la reproducción.

Las poblaciones endocriadas se obtienen por el cruzamiento de hermanos con hermanas luego de 20 generaciones como mínimo.

Las poblaciones de animales exocriados se obtienen apareando individuos no aparentados entre sí y se les denomina stock (35)

#### 1.8.8 MICROAMBIENTE Y MACROAMBIENTE



FUENTE: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf)

**FIGURA8. MICROAMBIENTE Y MACROAMBIENTE DEL RATÓN**

##### 1.8.8.1 Microambiente

El microambiente, es el ambiente físico inmediato que rodea al ratón, también llamado confinamiento o encierro primario, está limitado por el perímetro de la jaula o caja, cama,

alimento y agua de bebida; deben contribuir a la salud de los animales, y evitarles todo estrés, por lo que deberá asignársele, a cada uno, un espacio adecuado que le permita movimientos y adopciones de posturas normales, preservando a su vez las mínimas condiciones de higiene y de protección contra insectos, roedores y otras plagas.

El microambiente lo conforman la caja o jaula, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos (capítulo de cuidado y mantenimiento). (35)

#### **1.8.8.1.1 Caja o jaula**

Los ratones se alojan en cajas o jaulas especialmente diseñadas para facilitar su bienestar, pueden ser de metal o de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polysulfano), provistas de tapas de acero inoxidable con o sin filtro.

El poliestireno es transparente y resiste al autoclavado y a la mayoría de desinfectantes.

La altura de las paredes de la caja no debe ser menor de 12,7 cm. Debe tener las siguientes características:

- ♣ Proporcionar espacio adecuado, ser cerrado, seguro y protegerlo de las amenazas externas.
- ♣ Ser adecuado en ventilación.
- ♣ Ser resistente al lavado, desinfección y esterilización frecuente.
- ♣ Permitir la observación del animal.
- ♣ Tener pisos y paredes fáciles de limpiar (superficies lisas) y con tapa removible de rejillas o perforada.
- ♣ Mantenerse en buenas condiciones de uso
- ♣ Facilitar el acceso de los animales al agua y alimento.
- ♣ No presentar bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones. (25)

#### **1.8.8.1.2 Recomendaciones de espacio (densidad animal)**



El número de animales por jaula estará en relación con el tamaño corporal (edad del ratón, estado pre y postnatal) evitándose la sobrecarga.

El tamaño de las jaulas o cajas debe ser apropiado; por ejemplo, en el caso de ratones adultos, se requiere una superficie mínima de 80 cm<sup>2</sup> por animal.

El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para moverse y para expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad, debe tener fácil acceso al agua y alimento y debe tener un área suficiente con material de lecho limpio y sin obstáculos para moverse y descansar.(35)

En la siguiente tabla se muestra las recomendaciones del espacio asignado a roedores alojados en grupos; si se alojan individualmente o exceden los pesos listados, podrían requerir de más espacio, de acuerdo con el criterio profesional y de experiencia.

**TABLA 1. ESPACIOS RECOMENDADOS PARA RATONES DE LABORATORIO**

PESO EN GRAMOS	ÁREA DEL PISO POR ANIMAL EN cm <sup>2</sup>	ALTURA cm
Menor de 10	38.71	12.7
10-15	51.61	12.7
15-25	77.42	12.7
Mayor a 25	96.77	12.7

FUENTE:[http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf)



FUENTE: PALLO M. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH

**FOTOGRAFIA 3. RECOMENDACIONES DE ESPACIO**

#### **1.8.8.1.3 Lecho o cama**

Los lechos serán de material absorbente tal como la viruta de madera, la coronta molida del maíz (marlo), etc.; libres de polvillo, alérgenos y sustancias tóxicas. Deben ser esterilizables.

La viruta más adecuada es la de pino blanco, seguida por la de tornillo. (35)

Se debe tener especificaciones de calidad de la viruta para su adquisición, tales como:

- ♣ No ser nocivo.
- ♣ Capacidad de absorción
- ♣ No se recomienda el uso de viruta procedente de cedro o caoba.



FUENTE::PALLO M. Bioterio Facultad de Ciencias ESPOCH  
**FOTOGRAFÍA4. LECHO O CAMA**

#### **1.8.8.1.4 Agua de bebida**

El agua debe ser potable y suministrarse libremente durante toda la vida del animal, puede ser en frascos bebederos de vidrio o de policarbonato.

El agua debe ser acidificada, esterilizada mediante autoclave o por método de filtración.



FUENTE: PALLO M. Bioterio Facultad de Ciencias ESPOCH  
**FOTOGRAFÍA 5. BEBEDERO**

#### 1.8.8.1.5 Alimento: dietas y requerimientos

El alimento es el material primario a partir del cual se van a formar y renovar los tejidos y estructuras corporales, tanto las nuevas como las ya existentes, que deben ser remplazadas debido al proceso de desgaste. La nutrición es determinante en los estados sucesivos de crecimiento y producción de los animales, de ahí que haya alimentos específicos para cada especie y hasta para cada etapa de su vida.

Luego de su adquisición, se debe tener cuidado en el transporte, almacenamiento y manipulación del alimento para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades (por ejemplo insectos y otras plagas) y contaminantes químicos. (35)

Se debe contar con un procedimiento para la adquisición de alimento y los requisitos que este debe reunir, tales como:

- ♣ Composición, que deberá cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento del ratón.
- ♣ Debe ser agradable al paladar (palatable) y digestible.
- ♣ Tener fecha de elaboración y caducidad.
- ♣ Certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote.
- ♣ Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos.
- ♣ El alimento en forma de pellet debe tener la consistencia requerida, para evitar pérdida del alimento y el animal pueda consumirlo. (35)



FUENTE::PALLO M. Bioterio Facultad de Ciencias ESPOCH

## FOTOGRAFÍA 6. ALIMENTO

**TABLA 2. ALIMENTO Y REQUERIMIENTOS PARA RATONES**

COMPONENTE	%
Proteína cruda	20
Grasa cruda	9.81
Fibra cruda	2.15
Cenizas	6.38
Consumo diario de alimento	3-6 g
Consumo diario de agua	3-7 mL

FUENTE: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf)



FUENTE: PALLO M. Bioterio Facultad de Ciencias ESPOCH

## FOTOGRAFÍA7. ALIMENTO Y BEBEDERO

### 1.8.8.2 Macroambiente

El macroambiente es el espacio inmediato al microambiente y es la sala de alojamiento en su ámbito general.

La alteración de los factores del macroambiente producirá cambios en el modelo animal y con ello, la modificación del tipo de respuesta, y aumento de la variabilidad de los resultados entre o dentro de los laboratorios de experimentación. (35)

#### 1.8.8.2.1 Aire y ventilación

Los ambientes destinados a la producción de animales, en su interior, deben poseer ventilación con presión positiva de aire respecto a los pasillos o áreas exteriores, manteniendo las gradientes de presión, de tal forma que se evita el ingreso de patógenos desde el exterior.

En caso de poseer un bioterio de doble pasillo con locales centrales (circulación limpia y sucia), la gradiente de presión será del limpio hacia el sucio.

La ventilación es importante para controlar la humedad, calor, gasestóxicos. Se debe generar entre 15 a 20 recambios de aire / hora. (35)

Los sistemas de aire acondicionado o ventilación no podrán ser compartidos con otras áreas, serán exclusivos para el sector bioterio y con factores controlados de temperatura y humedad.

#### **1.8.8.2 Temperatura y humedad relativa**

Las exigencias de temperatura para ratones son de 20 a 25 °C y la humedad relativa ambiental entre 40 y 70%. (35)

Las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los diferentes tratamientos.

Si se requiere respuestas estandarizadas, las condiciones en que se mantienen los animales deben ser fijas. (35)

#### **1.8.8.3 Intensidad de luz y tipo de iluminación**

Los ambientes de crianza deben contar con la luz artificial, provista de lámparas fluorescentes tipo luz día, con incidencia oblicua, con una iluminación máxima de 323 luxa un metro del piso; de forma tal, que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares de luz.

La iluminación debe distribuirse adecuadamente a través de la sala de alojamiento y ser lo suficiente para las prácticas de mantenimiento, inspección y bienestar de estos, sin causarles signos clínicos a los animales. También debe proporcionar condiciones seguras de trabajo para el personal.

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda 12 horas luz/12 horas oscuridad, lo cual se programa con un reloj temporizador. (35)

#### **1.8.8.2.4 Ruido**

Los ratones son muy sensibles al ruido y pueden percibir frecuencias de sonido que son inaudibles para el ser humano, por lo que el personal debe tratar de minimizar la generación de ruido innecesario. El ruido excesivo e intermitente se puede minimizar capacitando al personal en modos alternativos a las prácticas que producen ruido. Los radios, celulares, alarmas y otros generadores de sonido, aun con auriculares o audífonos, no deben usarse en las salas de alojamiento de animales. Se permite un nivel máximo de ruido de 85 decibeles, si estos son mayores tiene efectos nocivos como estrés y problemas de fertilidad.

#### **1.8.8.2.5 Olor**

El olor es otro factor que afecta al ratón, es por ello que no se debe utilizar desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes del bioterio. (35)

La percepción de amoníaco en el ambiente es un indicador de saturación del lecho, por lo que se recomienda tener programas de cambio de lecho según la población que se maneje.

Por ejemplo, se conoce que el hombre es capaz de percibir 100 ppm de amoníaco del ambiente del ratón y éste puede percibir desde 25 ppm de amoníaco. (35)

## **CAPÍTULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio de Farmacia, Bioteriote de la Facultad de Ciencias.

#### **2.2 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1 MATERIALES**

###### **2.2.1.1 Vegetal**

Como materia prima se utilizó las flores completas de Granadilla (*Passiflora ligularis*) secas.

La materia prima fue recogida en el mes de Abril del 2012 en la provincia de Tungurahua, Cantón Patate.

###### **2.2.1.2 Extracto**

Para el extracto se utilizó:

1. Alcohol (96%)
2. Flores de Granadilla (*Passiflora ligularis*). (70 gramos)

### 2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

1. Vasos de precipitación
2. Trípode
3. Crisol
4. Embudo simple
5. Papel filtro
6. Reverbero
7. Varilla de agitación
8. Pipetas volumétricas
9. Cápsulas de porcelanas
10. Matraces
11. Probetas
12. Embudo simple y buchner
13. Balones esmerilados
14. Equipo de destilación
15. Papel aluminio
16. Tubos de ensayo

#### 2.2.2.1 Materiales y reactivos para evaluar la actividad ansiolítica (ensayo pre clínico)

##### **a. Materiales:**

1. Algodón
2. Bandejas de plástico
3. Caja de guantes y mascarillas
4. Jeringas
5. Balones aforados
6. Cánulas.



### **b. Reactivo biológico**

Ratones *Mus musculus* del Bioterio de la Facultad de Ciencias. ESPOCH.

### **c. Reactivos:**

1. Extracto de flores de Granadilla (*Passifloraligularis*) a dosis diferentes (0.01,0.007,0.004 mg planta/ kg peso)
2. Diazepam 10 mg (Sanderson S.A.)
3. Agua destilada
4. Alcohol antiséptico
5. Gel desinfectante

#### **2.2.2.2 Materiales y reactivos para evaluar la actividad ansiolítica (ensayo clínico)**

Extracto de flores de Granadilla (*Passifloraligularis*) a dosis diferentes.

#### **2.2.3 EQUIPOS**

1. Balanza analítica (BOECO)
2. Desecador
3. Estufa (MEMMERT)
4. Mufla (OPTIC IVYMEN SYSTEM)
5. Espectrofotómetro
6. Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
7. Computadora
8. Cámara Digital

### **2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS**

#### **2.3.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO**

##### **2.3.1.1. Determinación del contenido de humedad**

### **Método Gravimétrico**

Se pesó 2 g.  $\pm$  0.5 mg de droga cruda y se transfirieron a un pesa filtro previamente tarado y se secó a 100°C durante 3 horas. El pesa filtro se puso en un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó; colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.

Cálculos:

$$\% H = \frac{M_2 - M_1}{M} * 100$$

**FÓRMULA Nº 1**

Dónde:

H = Porcentaje de Humedad

M = masa de la muestra de ensayo (g).

M<sub>1</sub> = masa del pesa filtro con la muestra desecada (g)

M<sub>2</sub> = masa del pesa filtro con la muestra de ensayo (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

#### **2.3.1.2. Determinación de cenizas totales**

Se determina la masa de no menos de 2.0g ni más de 3.0g de la porción de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. Caliente suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante 2 horas.

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante)

Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de

peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

**FÓRMULA Nº 2**

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M1= masa del crisol con la porción de ensayo(g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático para los cálculos.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

### **2.3.1.3. Determinación de cenizas solubles en agua**

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750 °C, durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Expresión de los resultados.

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

**FÓRMULA Nº 3**

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M<sub>2</sub> = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

Los valores se aproximan a las décimas.

#### **2.3.1.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.**

A las cenizas totales obtenidas según la técnica, se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10min. Se lava el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a.; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo se deseca de 100a 105°C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica) Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante.

Expresión de los resultados

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

**FÓRMULA Nº 4**

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

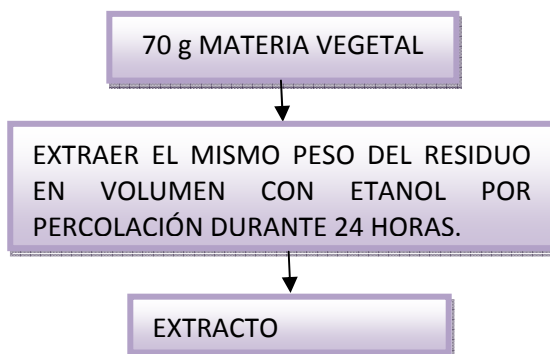
M<sub>2</sub>= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

Los valores se aproximan hasta las décimas.

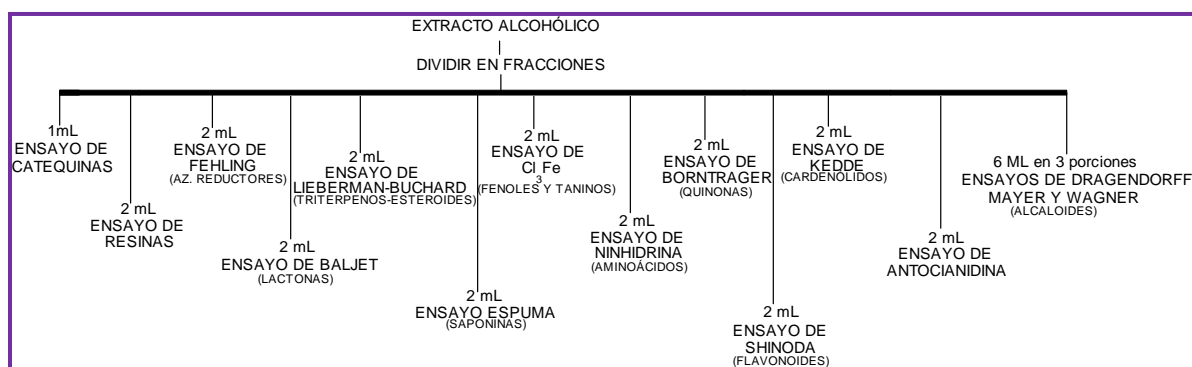
## **2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

El Tamizaje Fitoquímico se realizó en base a reacciones de coloración y precipitación para los grupos funcionales, se utilizó el siguiente esquema:



**FIGURA 9. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO.**

Al extracto alcohólico se procede de la siguiente manera ilustrada en la figura 11.



FUENTE: NORMAS RAMALES. DROGAS CRUDAS Y EXTRACTOS Y TINTURAS. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992.

**FIGURA 10. ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO.**

#### 2.4.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado,

(calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

#### 2.4.2 ENSAYO DE MAYER

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

#### 2.4.3 ENSAYO DE WAGNER

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

#### 2.4.4 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de

ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

**IMPORTANTE :** Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar as estructuras esteroideas de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

#### 2.4.5 ENSAYO DE BORNTAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

#### 2.4.6 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

#### 2.4.7 ENSAYO DE SUDÁN

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.

#### 2.4.8 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

#### 2.4.9 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.



#### 2.4.10 ENSAYO DE LA ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

#### 2.4.11 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

#### 2.4.12 ENSAYO DE LA NINHIDRINA

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

#### 2.4.13 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

#### 2.4.14 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

#### 2.4.15 ENSAYO DE FEHLING

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos.

## **2.5 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS**

### **2.5.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*)**

Los extractos vegetales se clasifican, según su consistencia en fluidos, blandos y secos. Como el propio nombre lo indica, los fluidos son líquidos y corresponden, en general, a la droga seca en una porción de 1:1 (1ml de extracto corresponde a 1 g de la droga seca). Los extractos blandos son semisólidos, con contenido de agua alrededor del 60%, mientras los extractos secos son sólidos, polvos o granulados. Los extractos secos y blandos pueden estar adicionados de ciertos coadyuvantes y sus especificaciones en lo relacionado al contenido de los principios activos y al residuo seco.

#### **2.5.1.1 Molienda**

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, sería igualmente muy lenta, una vez que las

membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción. En el caso específico de la droga previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo.



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 8. MOLIENDA**



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 9. MOLIENDA**



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 10. MOLIENDA**

### **2.5.1.2 Proceso de extracción**

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y de la naturaleza del solvente, las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua.

#### **Método por Percolación:**

1. A un recipiente de vidrio o acero inoxidable (tanque, cubeta o cubo) de poca profundidad, se le transfiere la droga cruda pesada y se humedece con menstruo,

procurando que no quede liquido residual. Se deja reposar de 15 min a 4 horas dependiendo de la dureza y características de la droga cruda.

2. En un percolador cuyo orificio de salida se cubre con algodón o gasa u otro material inerte, se transfiere la droga humectada. La superficie se cubre con papel o placa de filtro o un disco metálico con orificio y se presiona.
3. Para garantizar que no quede burbujas de aire en la masa vegetal, se vierte menstroo con l orificio de salida del percolador abierto y cuando este comienza a salir se cierra el mismo. Se sigue vertiendo menstroo hasta que este cubra la masa vegetal y quede de 3-5 cm por encima de ella. Se recircula la tercera parte del volumen del líquido contenido en el percolador y si baja el nivel del líquido, este se repone. Se macera durante 24h.
4. Se abre el orificio de salida del percolador a la vez que se añade más menstroo, estableciéndose un flujo de 3-5 cm mL/min hasta obtener la cantidad de tintura necesaria. (Sobre la base de un Kg de droga): 10 L si es tintura al 10%, 5L si es tintura al 20%, 2 L si es tintura al 50%.
5. Se deja reposar en un recipiente bien cerrado según l siguiente esquema: de 8 a 10°C, no menos de 4 días. De 15 a 20°C 15 días, temperatura ambiente 30 días.

### 2.5.1.3 Concentración del extracto



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 11. CONCENTRACION DEL EXTRACTO**

La concentración representa la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de extracción busca aumentar el contenido de sólidos en el extracto con la finalidad de:

- a) Alcanzar un determinado contenido del residuo seco
- b) Fabricar extractos blandos
- c) Como etapa preliminar en la producción de extractos secos.(16)

## 2.5.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

### a) ALCALOIDES

1. Se pesa 5 gramo de droga en polvo
2. Añadir 50 ml de metanol
3. Llevar a reflujo por 30 minutos.
4. Filtrar
5. Se aplica 20uL del concentrado en una placa cromatografía de sílica gel 60 F<sub>254</sub> con la ayuda de un capilar.
6. Se deja secar después de cada aplicación.
7. Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
8. Se retira de la cuba y dejar secar para luego observar en la lámpara UV 365 nm.
9. Finalmente se revela la placa y dejar secar, calentar en la estufa y anotar los Rf.

Absorbente: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Sistema de solventes: Acetato de Etilo;Isopropanol; Amoniac (80:15:5)

Revelador: Dragendorff

### b) FLAVONOIDES

1. Se pesa 1 gramo de droga en polvo
2. Añadir 10 ml de metanol
3. Llevar a baño maría (60<sup>0</sup>C) por 5 minutos.
4. Filtrar
5. Se aplica 20uL del concentrado en una placa cromatografía de sílica gel 60 F<sub>254</sub> con la ayuda de un capilar.

6. Se deja secar después de cada aplicación.
7. Se introduce la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
8. Se retira de la cuba y dejar secar para luego observar en la lámpara UV 365 nm.
9. Finalmente se revela la placa y dejar secar, calentar en la estufa y anotar los Rf.

Absorbente: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Sistema de solventes: Tolueno; Acetato de Etilo; Ácido acético (36:12:5)

Revelador: Sulfato de Cerio

### 2.5.3 CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

#### a) ALCALOIDES

1. Se pesa 5 gramo de droga en polvo
2. Añadir 50 ml de metanol
3. Llevar a reflujo por 30 minutos.
4. Filtrar
5. Se trasvasa a un balón volumétrico de 100 ml y se afora con metanol.
6. Se determina la absorbancia a 245nm.

#### b) FLAVONOIDES

1. Se pesa 1 gramo de muestra y colocar en un balón esmerilado de 250 ml.
2. Luego se añade 20 ml de etanol al 50 % y 8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
3. Se refluja por 2 horas en un baño de agua.
4. Se deja enfriar y filtrar a través del filtro Buchner, utilizando papel filtro.
5. Se lava el residuo con 10 ml de etanol al 50% para desecharlo totalmente.
6. El filtrado se evapora con baño de agua hasta la mitad del volumen inicial.
7. Se enfría sobre un baño de agua fría durante 30 minutos.
8. A continuación se filtra, el papel con el residuo se lava con 70 ml de etanol al 96% caliente a 50°C.

9. Se trasvasa a un balón volumétrico de 100 ml y se afora con etanol al 96%.
10. Se determina la absorbancia a 269nm.

La expresión empleada para los cálculos es:

$$\%Concentración = \frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ del\ estandar} \times Factor\ de\ dilución \times 100$$

FÓRMULA Nº 9

## 2.6 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO DE LAS FLORES DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*)

### 2.6.1 TÉCNICA

- ♣ Los animales son distribuidos en grupos de 3 aleatoriamente y se asigna al azar a cada grupo de tratamiento al que será sometidos. Se dividen en lotes de ratones de la siguiente manera:
- ♣ Blanco: Agua destilada
- ♣ Control positivo natural: Extracto de *Passifloraedulis*
- ♣ Control positivo químico: Diazepam
- ♣ Control negativo: No se administra sustancia alguna.
- ♣ Experimentales netos: Planta en estudio.
- ♣ Se ensayaran la dosis de 40, 70, 100 % de la sustancia a investigar
- ♣ Las mediciones se realizan cada 30 minutos después de la administración de las sustancias a investigar.

### 2.6.2 BIOENSAYO

- ♣ Seleccionamos aleatoriamente 6 grupos de tres ratones que servirán como Blanco, Control Positivo, Control Negativo, Experimento Neto.
- ♣ El primer grupo de tres ratones que servirá como Blanco se le administrara 0.2 ml de agua destilada por vía oral.
- ♣ El segundo grupo será el Control positivo y se le administrara 0.2 ml de extracto de *Passifloraedulis* por vía oral.



- ♣ El tercer grupo de tres ratones servirá como Control Negativo al cual no se le administrara ningún tipo de sustancia.
- ♣ El cuarto, quinto y sexto grupo de tres ratones se le administrara el extracto hidroalcohólico de la planta en estudio en diferentes concentraciones (40, 70 y 100%), por lo que a estos grupos se los denomina Experimento Neto.
- ♣ Cada concentración de extracto hidroalcohólico (40, 70, 100%) se aplicara in vivo directamente en *Mus musculus*, por vía oral una cantidad de 0.2 mL.
- ♣ El bioensayo se lo realizara por 3 ocasiones cada 2 días en *Mus musculus* en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias.
- ♣ A cada grupo de tres ratones se evaluara de acuerdo al test Laberinto (actividad exploratoria), Test de Curiosidad, Test de Incapacitación Motriz y Test de Actividad Mio-relajante.
- ♣ Se medirá los parámetros de comportamiento como: episodios de inmovilidad, aseo, arañazos, lamer, con este bioensayo se podrá evaluar la actividad del efecto ansiolítico del extracto.

#### 2.6.2.1 Ensayo de la actividad exploratoria (Test del Laberinto)



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 12. TEST DEL LABERINTO**

Permite estudiar la actividad exploratoria, funciones, la capacidad de percepción, discriminación y el nivel de emotividad y motivación. Este ensayo permite una

evaluación de la actividad estimulante o depresora de un principio activo, pudiendo aún indicar actividades más específicas como la ansiolítica.

### **Descripción del Método**

- ♣ A cada grupo de tres ratones se evaluara de acuerdo al test Laberinto, para lo cual se elaborara un laberinto de 100x100cm.
- ♣ Luego de 30 minutos de administrado lo correspondiente a los grupos se colocara el ratón el centro del laberinto y se medirá el tiempo gastado en cruzarlo.

#### **2.6.2.2 Test de curiosidad**



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 13. TEST DE CURIOSIDAD**

Este Test permite observar la disminución de la reacción inicial de la exploración que tiene un animal al ser colocado en un recinto nuevo. Se usa para medir este grado de curiosidad una placa cuadrada (40 x 40) provista de 16 agujeros, anotándose el número de veces, en un tiempo determinado, que el animal introduce la cabeza en uno de estos orificios. (CYTED 1995)

### **Descripción de la Técnica**

30 minutos después de la administración de las correspondientes dosis de control, productos patrones o productos de ensayo a lotes diferentes lotes de ratones, se colocan éstos en dicha placa y se anota durante 5 minutos el número de veces que introducen la cabeza en uno de los orificios.

#### **2.6.2.3. Test de incapacitación motriz (Test de la Chimenea)**



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 14. TEST DE LA CHIMENEA**

Esta prueba evalúa la capacidad de un ratón de subir marcha atrás (a reculones) por un tubo de vidrio, el cual tiene una marca a 20 cm. de uno de los extremos y cuyo diámetro varía según el peso del ratón (22 mm para un ratón de 15 a 18 g, y 28 mm para un ratón de peso comprendido entre 20 y 30 g). Se introduce el ratón por el extremo del tubo más próximo a la marca y cuando el ratón alcanza el otro extremo, el tubo se pone en posición vertical. Inmediatamente, el animal trata de subir a reculones por el tubo, llegando en condiciones normales a la marca en menos de 30 segundos. Si presenta incoordinación motriz no consigue hacerlo, por esta razón es necesario establecer condiciones iniciales antes de administrar el principio activo a ensayar, lo que nos servirá para descartar a individuos que no superan dicha prueba.

#### **Descripción del Test**

Se usan lotes de tres ratones machos a los que se les administra por vía oral, productos patrones. A los 30 minutos después de la administración, se utiliza la prueba, anotándose el tiempo que tardan en subir marcha atrás por el tubo. Se considera como fracaso cuando el animal no supera la marca antes de los 30 segundos.

#### **2.6.2.4 Test de actividad miorelajante (Test rota –rod)**



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍA 15. TEST ROTA –ROD**

Consta de un plano que gira alrededor de un eje a una velocidad regulable, en nuestro caso a 18 r.p.m. y que se encuentra dividido por discos opacos en secciones iguales que mantienen separados a los animales. Durante la prueba se cronometra el tiempo en que el animal se mantiene sobre la plancha, parando el cronómetro cuando el animal cae.

La prueba consiste en medir el tiempo que el ratón es capaz de mantenerse sobre la placa sin caerse de él. Un ratón en condiciones normales se mantiene como mínimo 180 segundos, tiempo que consideramos tope para la realización del test, mientras que si se presenta incoordinación motora, se cae antes.

#### **2.6.3 TÉCNICA PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA**

En un grupo de 3 ratones machos aplicaremos el extracto de la flor de granadilla al 100 %, en una dosis diaria vía oral, por 14 días consecutivos.

- ♣ Esta dosis se aplicara a la misma hora todos los días que se realice el estudio de toxicidad aguda.
- ♣ Al final de los 14 días del estudio de toxicidad aguda, se deberá dar eutanasia a los 3 ratones, para posterior obtener los riñones, hígado y estomago de cada uno de los ratones.
- ♣ Para así poder observar si existe daños de los órganos obtenidos en el proceso anterior.

## **CAPÍTULO III**

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Después de haber realizado los análisis y las pruebas biológicas, se han obtenido los resultados que se presentan a continuación.

#### **3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA SECA DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*).**

Mediante el control de calidad se determina si este producto es aceptado o rechazado, dependiendo si cumple o no con todos los requerimientos.

Cabe recalcar que en nuestro país las propuestas referentes a control de calidad, están aún en fase de aprobación, pero los análisis aquí descritos son los que están vigentes en algunos países de la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos. (31)

##### **3.1.1 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO**

##### **3.1.1.1. Determinación del contenido de humedad**

En la droga seca de las flores de Granadilla (*Passifloraligularis*), mediante el método gravimétrico se obtuvieron los siguientes resultados. (69)

**CUADRO Nº 1. HUMEDAD DE LA DROGA SECA DE LAS FLORES DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*).LABORATORIO DE FITOQUÍMICA ESPOCH. MAYO 2012.**

	%HUMEDAD	LÍMITE DE HUMEDAD
<b>Planta seca</b>	12.04	Hasta 14%

Los resultados expresados en el cuadro N°1 nos indica que el contenido de humedad de la Flor de Granadilla (*Passiflora ligularis*) es de 12.04% en planta seca. El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable del crecimiento de bacterias y hongos, y también de la hidrólisis de sus constituyentes. Con pocas excepciones, el contenido de agua en las drogas vegetales debe variar entre 8 y 14%. El valor obtenido en el ensayo por triplicado se encuentra dentro de los límites permitidos. (69)

### 3.1.1.2. Determinación de cenizas totales.

En la droga seca de la Flor de Granadilla (*Passiflora ligularis*), mediante el método gravimétrico de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl se obtuvieron los siguientes resultados.

**CUADRO N° 2. CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DE LA DROGA SECA DE LAS FLORES DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA ESPOCH. MAYO 2012.**

	% C.T	% C. SOLU. EN AGUA	% C.INS. HCl	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD SEGÚN LA USP XXVI
<b>Planta seca</b>	10.2	8.65%	1.45%	C.T 11% C.SOL. H <sub>2</sub> O 15% C.INS. HCl 3%

El resultado expresado en el cuadro N° 2 de la Flor de Granadilla (*Passiflora ligularis*), indica un contenido de cenizas totales de 10.2% mientras que las cenizas solubles en agua 8.65% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 1.45%.

Estos porcentajes son aceptados ya que están dentro de los límites de la USP (11%). Este análisis en condiciones rigurosas, es constante y nos permite descubrir falsificaciones por otras drogas, tierras u otros minerales. Esta determinación es fundamental pues la materia mineral puede ser responsable de alguna acción farmacológica no deseada. Si en la

determinación ha sido elevado el contenido de cenizas puede ser indicador que en la recolección existió contaminación de materia mineral (tierra). (57)

### 3.2 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO FLUIDO DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora Ligularis*)

El análisis de control de calidad se realizó sobre el extracto de las Flores de Granadilla (*Passiflora ligularis*) obtenido por percolación del vegetal con etanol al 96%.

#### 3.2.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar al fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. (16)

**CUADRO N°3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE DROGA SECA DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*) LABORATORIO DE FITOQUÍMICA ESPOCH. MAYO 2012.**

ENSAYO	METABOLITO	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO
DRAGENDORFF	ALCALOIDES	+++
WAGNER	ALCALOIDES	+++
LIEBERMAN BUCHARD	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	+
BORNTRAGER	QUINONAS	++
BALJET	COMPUESTOS LACTONICOS	++
SUDAN III	COMPUESTOS GRASOS	-
CATEQUINAS	CATEQUINAS	-
RESINAS	RESINAS	+
ESPUMA	SAPONINAS	-
CLORURO FERRICO	COMPUESTOS FENOLICOS Y/O TANINOS	+++
SHINODA	FLAVONOIDES	+++
ANTOCIANIDINAS	FLAVONOIDES	+++



FEHLING	PRESENCIA DE AZUCARES	+++
---------	--------------------------	-----

+++ : ALTA EVIDENCIA

++ : EVIDENCIA

+: BAJA EVIDENCIA

-: NEGATIVO

En el cuadro N°3 se puede apreciar los resultados obtenidos luego de haber realizado el tamizaje fitoquímico del extracto de la Flor de Granadilla (*Passifloraligularis*), el cual evidenció la existencia de los metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y/o taninos y azucares siendo estos los metabolitos de mayor evidencia presentes en el vegetal.

Cabe señalar que los metabolitos secundarios representativos con potencial farmacológico son los alcaloides y flavonoides, quienes le brindan la actividad ansiolítica.

Los resultados de este Tamizaje Fitoquímico se corroboran con varios estudios realizados de varias especies de la familia *Passifloracea* por Marroquín M., Osorio C. (2006), Acosta F. y colaboradores (2002), Rodrigues E. y colaboradores; en todos estos estudios se concluye que en esta familia están presentes flavonoides y alcaloides y en específico la crisina y harmano respectivamente, los mismos que probablemente son los responsables de la actividad ansiolítica que presentan las diferentes especies de plantas de la familia *Passifloracea*. (43, 48, 65).

### 3.2.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

**CUADRO N°4. Rf DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*) LABORATORIO DE FITOQUÍMICA ESPOCH. MAYO 2012.**

MANCHAS OBSERVADAS	CÁLCULOS $R_f$	COMPUESTOS IDENTIFICADOS	PLACAS
1	$Rf1 = \frac{5.6}{7} = 0.80$		
2	$Rf2 = \frac{4.5}{7} = 0.64$	Galangin	
3	$Rf3 = \frac{4.2}{7} = 0.60$	Crisina	
4	$Rf4 = \frac{2.9}{7} = 0.42$	7-Hidroxi flavona	
5	$Rf4 = \frac{2.1}{7} = 0.30$	Ácido Caféico	
6	$Rf4 = \frac{1.9}{7} = 0.27$	Quercetina	

FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

FOTOGRAFÍAS 16-17.

CROMATOGRAFIA FLAVONOIDES

Absorbente: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Sistema de solventes: Tolueno; Acetato de etilo; Ácido acético (36:12:5)

Revelador: Sulfato de Cerio

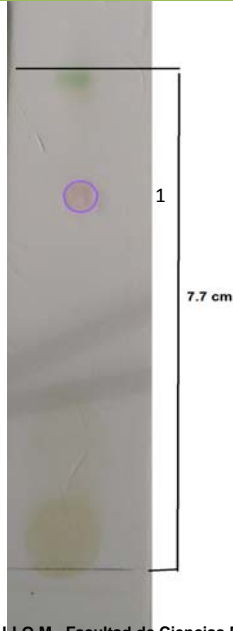
En la cromatografía en capa fina los metabolitos encontrados son los que se describen en el cuadro N°4, previamente calculados los Rf para identificarlos, siendo el más importante la crisina el cual se corrió con un estándar verificándose con los datos bibliográficos.

De acuerdo a los  $R_f$  de bibliografía(52)con los encontrados en la investigación, los flavonoides presentes en la flor de granadilla (*Passifloraligularis*) podrían ser:

- $R_f = 0.80$  3-Hidroxiflavona
- $R_f = 0.64$  Galangin
- $R_f = 0.60$  Crisina
- $R_f = 0.42$  7-Hidroxiflavona
- $R_f = 0.30$  Acido Caféico
- $R_f = 0.27$  Quercetina

La investigación fitoquímica de *P. incarnata*, *P. edulis* y el análisis ocasional en otras especies reveló que los miembros de este género contienen alcaloides, fenoles, compuestos cianogénicos y glicosilo flavonoides.

**CUADRO N°5.  $R_f$  DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) LABORATORIO DE FITOQUÍMICA ESPOCH. MAYO 2012.**

MANCHAS OBSERVADAS	CÁLCULOS $R_f$	COMPUESTOS IDENTIFICADOS	PLACA
1	$R_{f1} = \frac{5.6}{7.7} = 0.72$	Harmano	

FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**FOTOGRAFÍAS 18.**

**CROMATOGRAFIA ALCALOIDES**

Absorbente: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Sistema de solventes: Acetato de etilo; Isopropanol; Amoniac (80:15:5)

Revelador: Dragendorff

De acuerdo a los Rf de bibliografía(52)con los encontrados en la investigación, los alcaloides presentes en la flor de granadilla (*Passifloraligularis*) es el harmano.

### 3.2.3 CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

**CUADRONº6. CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*)UTILIZANDO DATOS BIBLIOGRÁFICOS COMO REFERENCIA LABORATORIO DE INSTRUMENTAL ESPOCH. MAYO 2012**

MUESTRAS	ABSORBANCIAS
Dato bibliográfico Harmano	Absortividad $A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1987$
Extracto de las flores de granadilla ( <i>Passifloraligularis</i> )	Absorbancia = 0.879

$$\%Concentración = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estandar}} \times \text{Factor de dilución} \times 100$$

$$\text{Concentración} = \frac{0.879}{1987} \times \frac{1\text{g H}}{100\text{mL}} \times \frac{100\text{ml}}{5\text{g M}} \times \frac{25\text{ml}}{1\text{mL}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}$$

$$\text{Concentración} = 221\text{mg Harmano}/100\text{gMuestra}$$

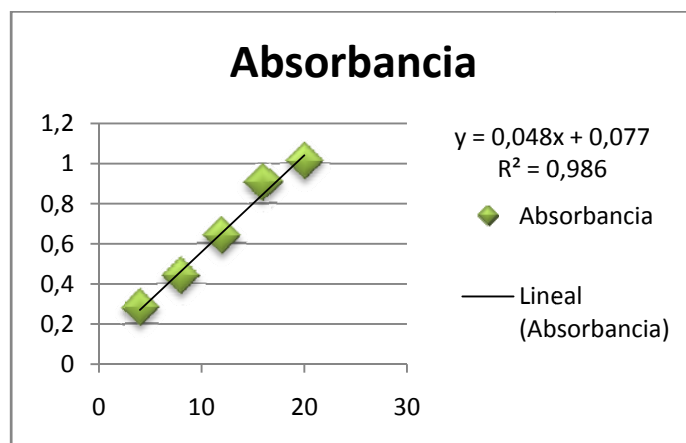
$$\%Concentración = 0.221 \%$$

El porcentaje de la cuantificación de alcaloides es de 0.221%, dicho análisis se realizó en base de datos bibliográficos debido a la inexistencia de un estándar para dicha determinación.

**CUADRO N°7.CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) UTILIZANDO CRISINA COMO MUESTRA ESTANDAR LABORATORIO DE INSTRUMENTAL ESPOCH. MAYO 2012**

Concentración ppm	Absorbancia
4	0.281

8	0.44
12	0.641
16	0.906
20	1.012



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**GRAFICO 1. CURVA DE CALIBRACION CRISINA**

Según datos de bibliografía los flavonoides, específicamente la crisina es el que le da la propiedad ansiolítica a la planta, al no haber los datos bibliográficos que nos proporcionen la concentración de crisina en los gramos de planta utilizados, se realizó la curva de calibración para conocer la concentración.

### **3.3 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO DE LA FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*) EN RATONES (*Mus musculus*)**

#### **3.3.1 EVALUACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS CON RESPECTO A VARIOS TRATAMIENTOS APLICADOS EN LA INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO DE FLOR DE GRANADILLA (*PASSIFLORA LIGULARIS*)**

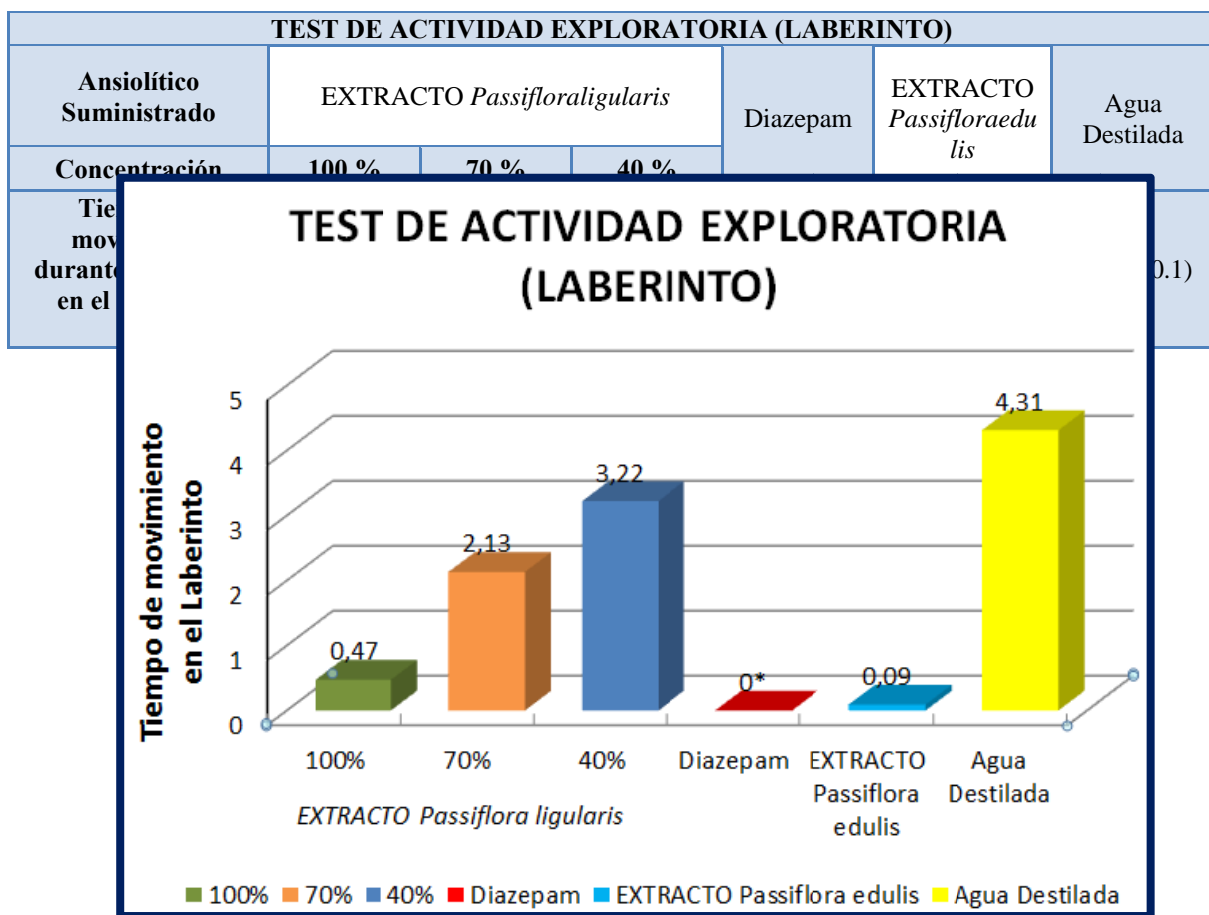
Para el estudio de la actividad ansiolítica se utilizó varios ensayos sobre el SNC con el objeto de confirmar esta actividad. Para ello, se realizaron los test de Actividad Exploratoria (laberinto), test de Curiosidad, test de Incapacitación Motriz (Chimenea) y test de Actividad Miorelajante (Rota-Rod), con la utilización de patrones de actividad conocida (Diazepam y *Passifloraedulis*) con las que se pudieran comparar los resultados, obteniéndose efectos positivos en todos los casos. Esto confirma que el extracto de *Passifloraligularis* en cualquiera de las concentraciones que se administró (100, 70 y 40%), es activo siendo evidente que la dosis optima es al 100%, las dosis del 70 y 40% presentan esta actividad solo que en una menor capacidad.

En este estudio se analizó la potencial actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de *Passifloraligularis*, para el fin se administró por vía orogástrica a los animales de experimentación tres dosis del extracto, para obtener una relación de 0.01, 0.007, 0.004 mg de planta/ kg peso. Se utilizó Diazepam y Extracto de *Passifloraedulis* como (Control Positivo) como medicamentos ansiolíticos, con el fin de comparar la eficacia y eficiencia de nuestra planta en estudio. Se realizaron los diferentes test a los 30 minutos después de la administración y se efectuó 3 réplicas de cada grupo.

Con los resultados de los diferentes Test para evaluar la actividad ansiolítica con las dosis fijadas en el modelo de diseño experimental (sección 2.6). Se procedió al análisis estadístico empleando para ello el análisis de varianzas ANOVA un factor con datos agrupados, con el objetivo de encontrar la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y los controles, posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples a un intervalo de confianza del 99% empleando la prueba de Tukey HSD, lo que permitió evaluar que grupos son similares y diferentes con respecto a los tratamientos y evaluar si existe o no actividad ansiolítica de nuestra planta, y si resulta ser igual o no al medicamento de control positivo químico y natural.

Para evitar gastritis en los ratones se uso extracto blando, evaporando el etanol, los resultados obtenidos se muestran a continuación:

**CUADRO N°8. INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) A UNA CONCENTRACIÓN DEL 100%, 70% Y 40%, BLANCO (AGUA DESTILADA), ESTÁNDAR QUÍMICO (DIAZEPAM) Y NATURAL (*Passifloraedulis*), TEST DE ACTIVIDAD EXPLORATORIA (LABERINTO). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**



\* No hay movimiento el ratón está dormido

FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**GRAFICO 2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA (LABERINTO) A LOS 30 MINUTOS DE LA ADMINISTRACION DE CADA ANSIOLITICIOBIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

**CUADRO N°9.COMPARACIONES MÚLTIPLES TUCKEY AL 99% DE CONFIANZA, TEST DE ACTIVIDAD EXPLORATORIA (LABERINTO)**

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
=====			
Variable Respuesta:	Actividad Exploratoria		
Variable Explicativa:	Grupos		
Número de Casos:	18		
Método: Tukey HSD al 99.00%			
-----			
Grupos	N	Media	Grupos Homogéneos
-----			
Diazepam	3	0.0000	X
Ex. P. E	3	0.0900	X
Ex. P. L 100%	3	0.4700	X
Ex. P. L 70%	3	1.7300	X
Ex. P. L 40%	3	2.8233	X
Agua Destilada	3	4.3100	X

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

En el test de Actividad Exploratoria (Laberinto), permite estudiar: funciones, la capacidad de percepción y discriminación y el nivel de emotividad y motivación. La tendencia natural del animal en un ambiente desconocido es explorarlo, a pesar del conflicto con el miedo provocado por el ambiente nuevo. Así, este ensayo permite una evaluación de la actividad estimulante o depresora de un principio activo, pudiendo aún indicar actividades más específicas como la ansiolítica.

Con este test se pudo evidenciar que los ratones tratados con *Passiflora ligularis* al 100% y *Passiflora edulis*, disminuyen la actividad exploratoria del animal, por lo que podemos afirmar que estos dos tratamientos tienen una actividad ansiolítica similar. Los tratamientos del 70 y 40% de *Passiflora ligularis* presentan una movilidad considerable,

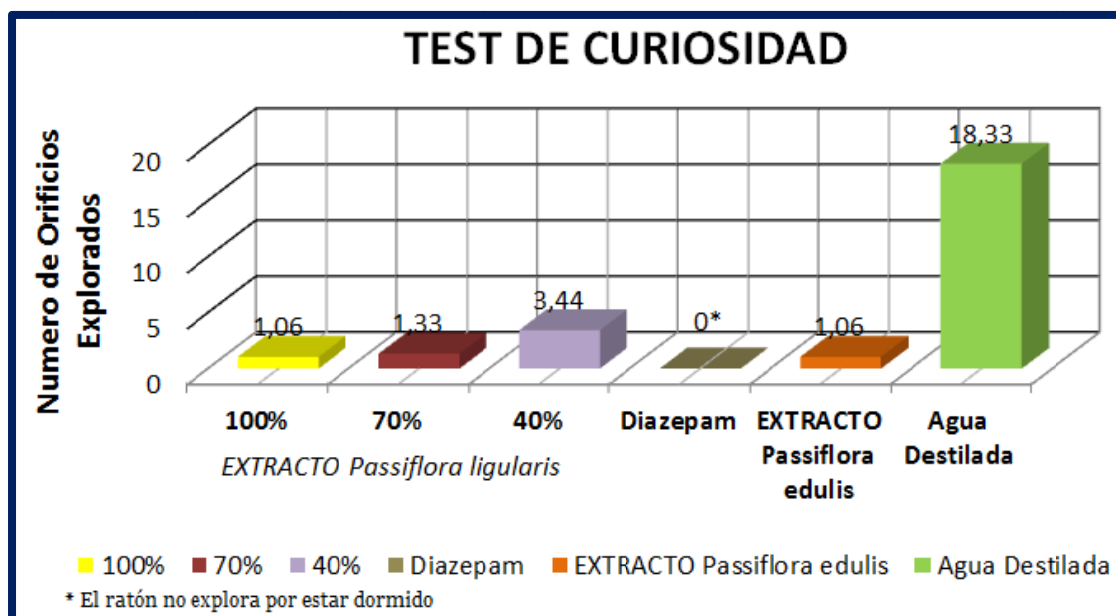


aun así estos presentan una cierta actividad ansiolítica. El blanco no presenta ninguna evidencia ansiolítica. En el Diazepam no presentan movilidad ya que es un medicamento que provoca sedación completa.

Estadísticamente como se indica en el apartado de anexos N° 10 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de la capacidad ansiolítica entre los diferentes grupos en el Test de Actividad Exploratoria (Laberinto) es menor al nivel de significancia del 5% (0.05), por lo que posteriormente se realizó la comparación múltiple para ver que grupos de tratamientos eran iguales y cuales diferentes ya que el análisis de ANOVA simplemente nos indica que al menos uno de ellos difiere significativamente de los demás. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 9, los tratamientos E (Diazepam), R (*Passifloraedulis*), D1 (*Passifloraligularis* 100%), son estadísticamente similares, y significativamente diferentes los grupos D2 (*Passifloraligularis* 70%) y D3 (*Passifloraligularis* 40%).

**CUADRO N°10. INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) A UNA CONCENTRACIÓN DEL 100%, 70% Y 40%, BLANCO (AGUA DESTILADA), ESTÁNDAR QUÍMICO (DIAZEPAM) Y NATURAL (*Passifloraedulis*), TEST DE CURIOSIDAD. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

TEST DE CURIOSIDAD						
Ansiolítico Suministrado	EXTRACTO <i>Passifloraligularis</i>			Diazepam	EXTRACTO <i>Passifloraedulis</i>	Agua Destilada
Concentración	100 %	70 %	40 %			
Numero de Orificios Explorados $\bar{X}$	1.06(±0.5)	1,33 (±0.2)	3,44(±0.6)	0	1.06(±0.4)	18,33(±0.9)



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**GRAFICO 3. DETERMINACION TEST DE CURIOSIDAD A LOS 30 MINUTOS DE LA ADMINISTRACION DE CADA SUSTANCIABIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

**CUADRO Nº11. COMPARACIONES MÚLTIPLES TUCKEY AL 99% DE CONFIANZA, TEST DE CURIOSIDAD**

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
Variable Respuesta: Curiosidad			
Variable Explicativa: Grupos			
Número de Casos: 18			
Método: Tukey HSD al 99.00%			
-----			
Grupos	N	Media	Grupos Homogéneos
-----			
Diazepam	3	0.0000	X
Ex. P. L 100%	3	0.6667	XX
Ex. P. E	3	0.6667	XX
Ex. P. L 70%	3	1.3333	XX
Ex. P. L 40%	3	3.4433	X
Agua Destilada	3	18.3333	X
-----			

**ANALISIS DE LOS RESULTADOS**

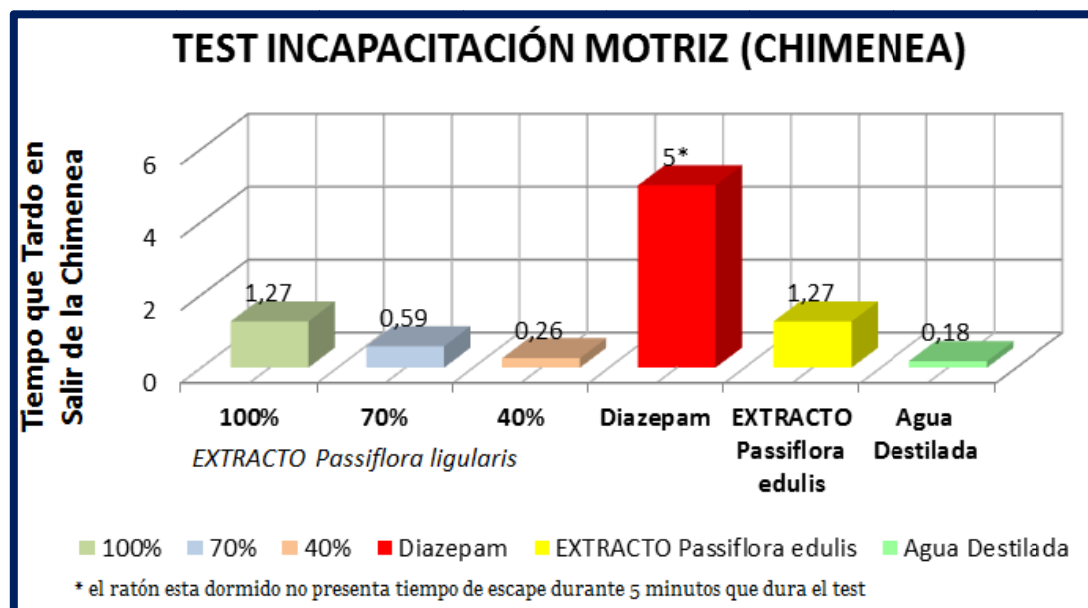
Este Test permite observar la disminución de la reacción inicial de la exploración que tiene un animal al ser colocado en un recinto nuevo.

De acuerdo a los datos obtenidos, los ratones tratados con *Passifloraligularis* al 100%, *Passifloraedulis*, disminuyen su actividad, presentando menos respuestas de curiosidad al inspeccionar el tablero, por lo que podemos afirmar que estos dos tratamientos tienen una actividad ansiolítica similar, a diferencia de los tratamientos al 40 y 70% de *Passifloraligularis* presenta una curiosidad un poco mayor pero todavía el extracto brinda su actividad ansiolítica. El blanco presenta gran curiosidad. En el Diazepam no presentan movilidad ya que es un medicamento que provoca sueño.

Como se expresa en el anexo N° 10 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de la capacidad ansiolítica entre los diferentes grupos en el Test de Curiosidad es menor al nivel de significancia del 5% (0.05), por lo que posteriormente se realizó la comparación múltiple para ver que grupos de tratamientos eran iguales y cuales diferentes ya que el análisis de ANOVA simplemente nos indica que al menos uno de ellos difiere significativamente de los demás. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 11, los tratamientos E (Diazepam), D1 (*Passifloraligularis* 100%), R (*Passifloraedulis*) y D2 (*Passifloraligularis* 70%), son estadísticamente similares, y el grupo D3 (*Passifloraligularis* 40%) es significativamente diferente.

**CUADRO N°12. INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) A UNA CONCENTRACIÓN DEL 100%, 70% Y 40%, BLANCO (AGUA DESTILADA), ESTÁNDAR QUÍMICO (DIAZEPAM) Y NATURAL (*Passifloraedulis*), TEST INCAPACITACIÓN MOTRIZ (CHIMENEA). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

TEST INCAPACITACIÓN MOTRIZ (CHIMENEA)						
Ansiolítico Suministrado	EXTRACTO <i>Passifloraligularis</i>			Diazepam	EXTRACTO <i>Passifloraedulis</i>	Agua Destilada
Concentración	100 %	70 %	40 %			
Tiempo que tarda en salir de la Chimenea $\bar{X}$	1,27(±0.2)	0,59(±0.1)	0,26 (±0.04)	5.00	1,27(±0.2)	0,18(±0.01)



**GRAFICO 4. DETERMINACION TEST INCAPACITACION MOTRIZ (CHIMENEA) A LOS 30 MINUTOS DE LA ADMINISTRACION DE CADA SUSTANCIABIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

**CUADRO Nº13. COMPARACIONES MÚLTIPLES TUCKEY AL 99% DE CONFIANZA, INCAPACITACIÓN MOTRIZ (CHIMENEA)**

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
-----			
Variable Respuesta:	Incapacitación Motriz		
Variable Explicativa:	Grupos		
Número de Casos:	18		
Método: Tukey HSD al 99.00%			
-----			
Grupos	N	Media	Grupos Homogéneos
-----			
Agua Destilada	3	0.1833	X
Ex. P. L 40%	3	0.2667	XX
Ex. P. L 70%	3	0.5933	XX
Ex. P. L 100%	3	0.8733	X X
Ex. P. E	3	1.2700	X
Diazepam	3	5.0000	X
-----			

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

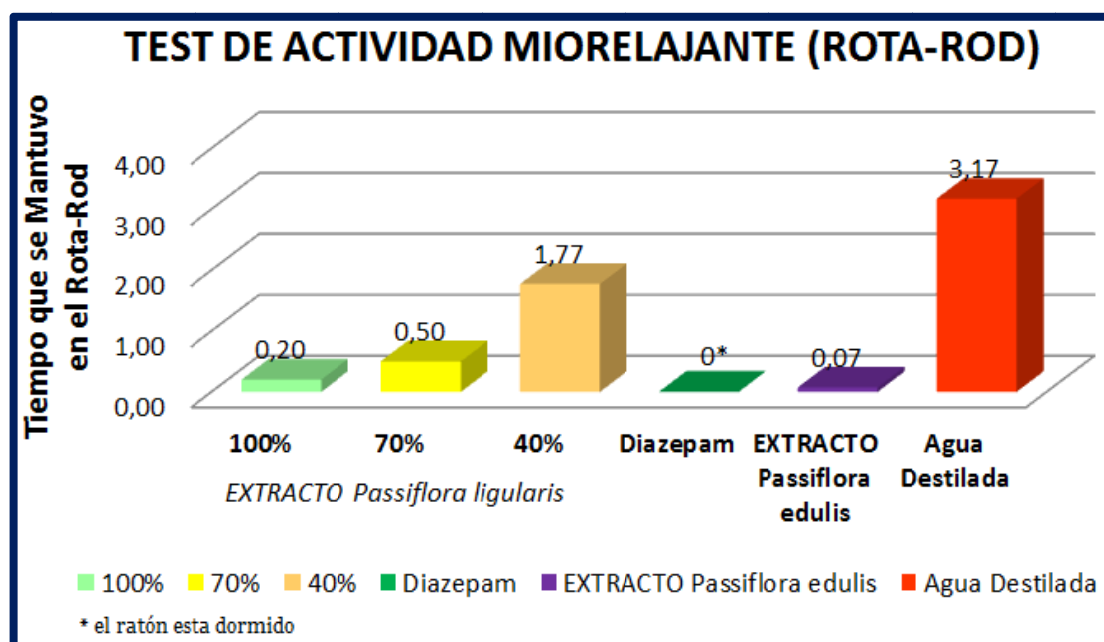
En el test incapacitación motriz (chimenea) indica la pérdida de capacidad motriz. Mide el tiempo que tarda en salir un ratón a reculones por un tubo. La diferencia de tiempo que emplea el ratón en salir en estado basal respecto al tratamiento, expresa la incapacidad motriz.

Con los datos obtenidos se pudo evidenciar que los tratamientos que presentan mayor tiempo de respuesta para el escape son los tratamientos con *Passiflora ligularis* al 100% y *Passiflora edulis*, estos dos tratamientos tienen una actividad ansiolítica similar, no así los tratamientos al 40 y 70% de *Passiflora ligularis*, su tiempo de escape fue menor a treinta segundos pero no es comparable con el blanco que presenta una respuesta a los 18 segundos, el Diazepam no presenta tiempo de escape ya que los animales de experimentación presentan sueño.

Como lo indica el anexo N° 10 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de la capacidad ansiolítica entre los diferentes grupos en el Test de Incapacitación Motriz (Chimenea) es menor al nivel de significancia del 5% (0.05), por lo que posteriormente se realizó la comparación múltiple para ver que grupos de tratamientos eran iguales y cuales diferentes ya que el análisis de ANOVA simplemente nos indica que al menos uno de ellos difiere significativamente de los demás. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 13, los tratamientos D3 (*Passifloraligularis* 40%) y D2 (*Passifloraligularis* 70%) son estadísticamente similares y D1 (*Passifloraligularis* 100%), R (*Passifloraedulis*) y E (Diazepam) son significativamente diferentes.

**CUADRO N°14. INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passifloraligularis*) A UNA CONCENTRACIÓN DEL 100%, 70% Y 40%, BLANCO (AGUA DESTILADA), ESTÁNDAR QUÍMICO (DIAZEPAM) Y NATURAL (*Passifloraedulis*), TEST DE ACTIVIDAD MIORELAJANTE (ROTA-ROD). BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

TEST DE ACTIVIDAD MIORELAJANTE (ROTA-ROD)						
Ansiolítico Suministrado	EXTRACTO <i>Passifloraligularis</i>			Diazepam	EXTRACTO <i>Passifloraedulis</i>	Agua Destilada
Concentración	100 %	70 %	40 %			
Tiempo que se mantuvo en el Rota-Rod $\bar{X}$	0,20(±0.01)	0,50(±0.1)	2,17 (±0.2)	0	0,07(±0.02)	3,17 (±0.06)



FUENTE: PALLO M. Facultad de Ciencias ESPOCH

**GRAFICO 5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MIORELAJANTE (ROTA-ROD) A LOS 30 MINUTOS DE LA ADMINISTRACION DE CADA SUSTANCIABIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

**CUADRO Nº15. COMPARACIONES MÚLTIPLES TUCKEY 99% DE CONFIANZA, TEST DE ACTIVIDAD MIORELAJANTE (ROTA-ROD)**

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples			
Variable Respuesta:		Actividad Miorelajante	
Variable Explicativa:		Grupos	
Número de Casos:		18	
Método: Tukey HSD al 99.00%			
-----			
Grupos	N	Media	Grupos Homogéneos
-----			
Diazepam	3	0.0000	X
Ex. P. E	3	0.0700	X
Ex. P. L 100%	3	0.1967	X X
Ex. P. L 70%	3	0.5467	X
Ex. P. L 40%	3	1.7633	X
Agua Destilada	3	3.1700	X
-----			

**ANALISIS DE LOS RESULTADOS**

El test de actividad miorelajante (rota-rod) es utilizado para evaluar la coordinación motora de los roedores, y es especialmente sensible en la detección de disfunción del cerebelo. En este test se pudo evidenciar que los tratamientos que presentan menor tiempo de permanencia en el Rota-Rod son los tratamientos con *Passiflora ligularis* al 100%, y *Passiflora edulis*, estos dos tratamientos tienen una actividad ansiolítica similar, no así los tratamientos al 40 y 70% de *Passiflora ligularis* tienen un tiempo de permanencia en el Rota-Rod mayor, lo que implica que la actividad ansiolítica de estos tratamientos es menor. En el caso del blanco el tiempo de permanencia es mayor al no presentar relajación. En el Diazepam no presentan movilidad ya que es un medicamento que provoca sedación completa.

Como lo indica el anexo N° 10 el p-valor obtenido al comparar las varianzas de la capacidad ansiolítica entre los diferentes grupos en el Test de Actividad Mio-relajante (rota-rod) es menor al nivel de significancia del 5% (0.05), por lo que posteriormente se realizó la comparación múltiple para ver que grupos de tratamientos eran iguales y cuales diferentes ya que el análisis de ANOVA simplemente nos indica que al menos uno de ellos difiere significativamente de los demás. Así como lo indica esquemáticamente el cuadro N° 15, los tratamientos E (Diazepam), R (*Passifloraedulis*) y D1 (*Passifloraligularis* 100%) son estadísticamente similares. Los tratamientos D2 (*Passifloraligularis* 70%) y D3 (*Passifloraligularis* 40%) son significativamente diferentes.

Los resultados presentados aquí son consistentes con otros estudios que encontraron efectos ansiolíticos como los estudios farmacológicos y químicos realizados de extractos acuosos estandarizados de hojas de *Passifloraalata* y *Passifloraedulis*, mostraron que contiene flavonoides. Los resultados farmacológicos mostraron que los extractos de *Passifloraalata* en dosis de 100 y 150 mg/kg y *Passifloraedulis* en dosis de 50, 100 y 150 mg/kg resultaron ansiolíticos por vía intra peritoneal. Utilizando ratones de la cepa NIH, que estuvieron provistos de agua y alimento ad libitum.

Se realizó la prueba de memoria y test de nado forzado, mostrando un efecto ansiolítico a las dosis administradas. (Paris F. y colaboradores 2002). (68)

En otro estudio realizado por Cardenas J. abril 2012 de la *Passifloraincarnata*, en la que se emplearon ratones albinos sepa BALB/c (*Mus musculus*), con un peso de 22 a 24 g. Se evaluó el ensayo de la chimenea actividad motora, ensayo de tabla agujereada o de curiosidad, y conducta de entierro, se administró dosis de 750mg/Kg y 1000mg/Kg de peso.

Los resultados de esta investigación muestran que el extracto de *Passifloraincarnata* disminuye selectivamente la conducta en cada uno de los test realizados. (67)

### **3.3 TOXICIDAD AGUDA Y ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO**

El estudio de toxicidad aguda, no reportó ningún deceso de los animales de experimentación sometidos a la dosis administrada por vía orogástrica.

Así como su comportamiento fue normal a lo largo de la fase de estudio y no afecta la ganancia en peso de los animales en prueba.

A continuación se resumen las observaciones realizadas diariamente durante 14 días posteriores a la administración de la dosis única del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla *Passifloraligularis*:

**CUADRO N°16. REPORTE DE SIGNOS CLÍNICOS DE LOS RATONES EN PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE FLOR DE GRANADILLA *Passifloraligularis* APLICANDO UNA CONCENTRACIÓN DE 0.01 MG/KG DE PESO. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH. JULIO 2012**

SIGNOS CLÍNICOS	DÍAS													
Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ojos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sist. Respiratorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Circulatorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN Autónomo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mudanza de pelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temblores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedación	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Somnolencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muerte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros (pelo erizado)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Además se evaluó la organotoxicidad a nivel histológico de los órganos farmacocinéticos más representativos (Estómago, Hígado, Riñón), resultando negativo para daño histológico a la dosis administrada, resultado emitido por el Dr. Oswaldo Duque (Patólogo SOLCA-RIOBAMBA). Con estos estudios realizados resulta ser segura y eficaz nuestra planta a las dosis establecidas.



## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

1. El tamizaje fitoquímico de la Flor de Granadilla (*Passifloraligularis*) demostró la presencia de varios metabolitos secundarios como: Alcaloides, Flavonoides, Azúcares, Taninos, Lactonas, Quinonas, por TLC se comprobó la presencia del flavonoide crisina y alcaloide del tipo harmana responsables de la actividad ansiolítica.

2. Experimentalmente se pudo comprobar el efecto ansiolítico de la Flor de Granadilla, *Passifloraligularis* mediante estudios pre-clínicos en ratones (*Mus musculus*) utilizando el test de Actividad Exploratoria (laberinto), test de Curiosidad, test de Incapacitación Motriz (Chimenea) y test de Actividad Miorelajante (Rota-Rod), en los cuales se evidencia que el Tratamiento de Extracto Hidroalcohólico de Flor de Granadilla, *Passifloraligularis* al 100% tiene la misma acción ansiolítica que el de la *Passifloraedulis* del Diazepam. Los tratamientos al 70 y 40% presentaron una actividad ansiolítica en menor grado.

3. Luego de realizado el estudio de toxicidad del extracto Hidroalcohólico de Flor de Granadilla, *Passifloraligularis* por un periodo de catorce días, administrando la de mayor concentración (100%), que equivale a 0.01 mg/kg, se puede concluir que se trata de un

tratamiento seguro incapaz de producir alguna alteración en el hígado, estómago y riñones, datos confirmados en el estudio histopatológico de dichos órganos cuyo reporte lo podemos encontrar en el apartado de anexos del presente trabajo de investigación.

## CAPÍTULO V

### 5. RECOMENDACIONES

1. Un estudio en el que se pueda llegar a evidenciar actividad ansiolítica de otras especies de *Passiflora*, complementado el estudio con la comprobación de la presencia o ausencia del harmano.
2. En este estudio se administró el tratamiento por vía oral, es evidente que tiene actividad ansiolítica frente al Diazepam y *Passifloraedulis*, la complicación radica en el tiempo de duración del efecto que para nuestra planta es muy corto; con esto recomendamos que se analice la forma farmacéutica y vía de administración adecuada para prolongar el tiempo de efecto de nuestro tratamiento.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

Comprobar el efecto ansiolítico de la flor de granadilla (*Passiflora ligularis*) en ratones (*Mus musculus*), mediante los test de Actividad Exploratoria (laberinto), test de Curiosidad, test de Incapacitación Motriz (Chimenea) y test de Actividad Miorelajante (Rota-Rod), los cuales se realizaron a los 30 minutos después de la administración. El mismo se realizó en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH.

Se utilizó 18 ratones divididos en 6 grupos iguales denominados: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> (Grupos de experimentación neta), B (Blanco), E (Control positivo químico), R (Control positivo natural). Los grupos: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, recibieron como tratamiento extracto de la flor de granadilla, a una concentración de 100%, 70%, 40% respectivamente. El grupo control positivo natural recibió *Passiflora edulis*, el grupo control positivo químico se le administro Diazepam, el blanco únicamente vehículo. Para el análisis de datos obtenidos, se utilizó los test ANOVA (análisis de varianzas) y Tukey 99%. Después de haber aplicado el tratamiento de extracto de la flor de granadilla, se evidenció una actividad ansiolítica en las tres concentraciones, siendo la dosis más efectiva la de concentración al 100%. Además se probó con el estudio toxicológico e histopatológico que las dosis administradas resultaron no ser nocivas, e histológicamente seguras sobre los órganos farmacocinéticos involucrados (Estomago, Hígado, Riñón).

Concluyo de esta manera que, el uso de extracto de flor de granadilla, como agente ansiolítico, queda científicamente comprobado con la presente investigación, y además que los metabolitos secundarios protagonistas en dicha capacidad farmacológica son compuestos Fenólicos con prototipo Flavónico y Alcaloides.

Recomiendo que a partir de este trabajo científico, se prosigan futuras investigaciones sobre *Passiflora ligularis*, que contribuyan a mejorar el estilo de vida del paciente con trastorno de ansiedad.

## ABSTRACT

To prove the anxiolytic effect of passionflower (*Passifloraligularis*) in mice (*Musmusculus*), using the Exploratory Activities test (maze), Curiosity Test, Motor Disability Test (Chimney) and Myorelaxant Activity Test (Rota-Rod), which were conducted at thirty minutes after the administration. It was carried out in the Biochemical Pharmaceutical School's Bioterio of ESPOCH. It was used 18 mice divided into six equal groups called: D1, D2, D3 (Groups of Pure Experimentation), B (White), E (Positive Chemical Control), and R (Natural Positive Control). The groups: D1, D2, D3, received as treatment passionflower extract, with a concentration of 100%, 70%, 40% respectively. The Natural Positive Control group received *Passifloraedulis*, The Positive chemical Control group received Diazepam, the White only vehicle. For analysis of obtained data, was used the ANOVA test (Variance Analysis) and Tuckey 99%. After applying the treatment of passion flower, it demonstrated an anxiolytic activity in the three concentrations, being the most effective dose the concentration 100%. Furthermore, it was tested with this toxological and hispathologic study that the administer dose were no damaging, and histological safe on organs pharmacokinetic involve (stomach, liver, kidney).

I concluded that, the use of passionflower extract, as an anxiolytic agent, is scientifically proved with this researched work, also the secondary metabolites protagonist in this pharmacological in this capacity are Phenolic compounds with Flavonic and Alkaloid prototype.

I recommended since this researched work, that future researches about *Passifloraligularis* will continue, they will contribute to improve the lifestetyle of patients with anxiety disorder .

## **CAPÍTULO VII**

### **6. BIBLIOGRAFÍA**

#### **BIBLIOGRAFÍA DE LIBROS**

1. **ALARCON, R.**, Psiquiatría 9<sup>a</sup>. ed., México Panamericana., 2005.,Pp. 122
2. **CONTRERA, E.**, Retorno a las Plantas Medicinales., Ed Ciencia y Técnica., Madrid- España., 2004., Pp, 56-58
3. **DARR, A.**, Tecnología Farmacéutica., Madrid-España Acribia., 1982., Pp. 24.
4. **FLORES, R.**, Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas. 2<sup>a</sup>.ed. Madrid, Cultural, 1998. Pp. 93-94
5. **FLOREZ, J.**, Farmacología Humana., México-México., Mazón., 2003., Pp. 204-205.
6. **FREIRÉ, H.**, Química General., Quito-Ecuador., Segunda Edición., Pp. 18-40
7. **GOODMAN, GILMAN.**, Las bases farmacológicas de la terapia., 11<sup>a</sup>. ed. México., McGraw Hill., Pp 429-453
8. **HARRISON, J.**, Farmacognosia., 14<sup>a</sup>. Ed Buenos Aires., Panamericana., 2000., Pp.135-147.
9. **HOWARD, G.**, Psiquiatría General., 5<sup>a</sup>.ed Atlanta Jasen., 2005., Pp. 323
10. **LOCK, O.**,Análisis Fitoquímico y Metabolitos secundarios. Es Salud (Venezuela). 2004. 15-27.
11. **OLÓRT EGUI, F.**, Diccionario de Psicología., Buenos Aires.,San Marcos., 1993., Pp. 100
12. **RODRÍGUEZ, R.**, Guía de farmacología y terapéutica. , 5<sup>a</sup>. ed., MéxicoMcGraw Hill., 2007., Pp. 51-55

13. **ROERSCH, C.**, Plantas Medicinales., 4<sup>a</sup>. ed., Alemania.,KoeltzScientificBookeKonigstein., 2004., Pp. 234, 235, 245-249
14. **ROSETEN, E.**, Diccionario de Especialidades Farmacéutica PLM., 21<sup>a</sup> ed., 1994., Pp. 528,529
15. **ROSERO, M.**, Efecto Hipoglucemiante del Extracto Acuoso de Canela (*CinnamomumZeylanicum*), en Ratas (*Rattusnovergicus*) con Hiperglicemia Inducida.,2010., Riobamba-Ecuador., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Pp 40-75
16. **SHARAPIN, N.**, Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos., 1a. ed., Bogota Colombia., Pp. 28-57
17. **VANACLOCHA, B., CAÑIGUERAL, S.**, Fitoterapia., Vademécum de Prescripción., 4<sup>a</sup>. ed., México., ElsevierMasson., 2003 Pp.178

#### **BIBLIOGRAFÍA INTERNET**

##### **18. ALCALOIDES DERIVADOS DEL TRIPTOFANO**

<http://es.scribd.com/doc/91873278/ALCALOIDE>

2012-06-07

##### **19. ANSIEDAD**

[http://www.univo.edu.sv:8081/tesis/019060/019060\\_Cap1.p](http://www.univo.edu.sv:8081/tesis/019060/019060_Cap1.pdf)

[df](http://www.univo.edu.sv:8081/tesis/019060/019060_Cap1.pdf)

2012-03-12

##### **20. ANSIEDA**

<http://www.salud.com/enfermedades/ansiedad.asp>

2012-03-12

##### **21. APRENDER A PLANEAR, REALIZAR Y REPORTAR UNA INVESTIGACION**

<http://www.uv.mx/univirtual/aprendeplanear/tecnica/node/84.html>

2012-06-07

## **22. BÚSQUEDA DE ALCALOIDES EN LOS CULTIVOS DE CALLOS DE *PASSIFLORA ALATA***

[http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.scielo.br/scielo.php%3Fscript%3Dsci\\_arttext%26pid%3DS1516-89132010000400020](http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.scielo.br/scielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS1516-89132010000400020)

2010-09-12

## **23. CATEGORIAS HERBOLARIAS**

[http://www.deturno.com/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=58:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:onarticulo&Itemid=75](http://www.deturno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=58:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:onarticulo&Itemid=75)

2009-01-03

## **24. CLASIFICACIÓN TAXONOMICA**

<http://www.biosiam.org/portal/species/browse/taxon/143307>

2012-06-20

## **25. DIAZEPAM**

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m043.htm>

2012-06-20

## **26. DIAZEPAM**

<http://www.cun.es/area-salud/Medicamentos/diazepam>

2011-11-14

## **27. DIAZEPAM: INFORMACION PARA PACIENTES**

<http://www.medizzine.com/pacientes/medicamentos/D/diazepam.php>

2012-06-26

## **28. DIRECTORIO DE ENFERMEDADES. ANSIEDAD**

<http://www.entornomedico.org/enfermedadesdelaalaz/index.php?option=comcontent&view=article&id=108:ansiedad&catid=35:enfermedades&Itemid=56>

2012-03-12

**29. EL COMERCIO. NOTICIAS**

[http://www.elcomercio.com/noticiaEC.asp?id\\_noticia=150163&id\\_seccion](http://www.elcomercio.com/noticiaEC.asp?id_noticia=150163&id_seccion)

2011/02/16

**30. ESTUDIO DE LA ANSIEDAD. REVISTA ELECTRONICA DE PSICOLOGIA**

<http://www.psicologiacientifica.com/bv/psicologia-69-1-estudio-sobre-ansiedad.html>

2012-03-12

**31. FARMACOLOGIA DE LAS BENZODIAZEPINAS Y DE LA TRASMISION GABAERGICA.**

[http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas\\_farma/volumen5/2\\_benzodiaz.pdf](http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen5/2_benzodiaz.pdf)

2011/02/16

**32. FITOTERAPIA**

<http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM>

2010-04-19

**33. FLAVONOIDE**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide>

2010/09/17

**34. FLOR DE LA PASIÓN USOS MEDICINALES, INTERACCIONES, EFECTOS SECUNDARIOS, DOSIS**

<http://es.hicow.com/flor-de-lapasi%C3%B3n/ansiol%C3%A1ticos/ensayo-cl%C3%ADnico-2142982.html>

2012-06-07

**35. GUIAS CLINICAS DE ATENCION PRIMARIA**

[http://www.dipucadiz.es/opencms/export/sites/default/dipucadiz/galeriaFicheros/drogodependencia/Guxa\\_Clxnica\\_Ansi](http://www.dipucadiz.es/opencms/export/sites/default/dipucadiz/galeriaFicheros/drogodependencia/Guxa_Clxnica_Ansi)



edad Generalizada y Benzodiacepinas. S. de Psiquiatría  
del Hospital Juan Canalejo. SERGAS.pdf  
23/03/2004

**36. GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE  
LABORATORIO: RATÓN**

[http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf)  
2012-06-20

**37. GRANADILLA (*Passifloraligularis*)**

<http://agronomoglobal.blogspot.com/2012/01/granadilla-passiflora-ligularis.html>  
2012-01-13

**38. HARMAN (Alcaloides y derivados de la familia)**

[http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.extrasynthese.com/catalogue/alkaloids\\_and\\_derivatives/harman,r21,p1175300,c0640.html](http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.extrasynthese.com/catalogue/alkaloids_and_derivatives/harman,r21,p1175300,c0640.html)  
2012-06-15

**39. LA DEPRESIÓN ANSIOSA CONSTITUYE EL 90 POR  
CIENTO DE LAS CONSULTAS PSIQUIÁTRICAS  
REALIZADAS EN ATENCIÓN PRIMARIA**

[http://www.acceso.com/display\\_release.html?id=8891](http://www.acceso.com/display_release.html?id=8891)  
20021121

**40. LA HISTORIA DEL DIAZEPAM (VALIUM GENERICO)**

<http://www.diazepamansioliticos.com/historia-del-diazepam.aspx>  
2012-06-20

**41. LA MEDICINA TRADICIONAL**

<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/6296-La-medicina-tradicional>  
2009-06-21

**42. LAS PLANTAS MEDICINALES**

<http://www.cfnavarra.es/BIF/boletines/14/1401.htm>

2009-03-25

**43. MARACUYA; UNA GRAN ALTERNATIVA COMO FITOMEDICAMENTO**

<http://www.escuelaavicena.com.ar/pdf/maracuya-alternativa-fitomedicamento.pdf>

2009-03-25

**44. MECANISMOS GENERALES DE DEFENSA: ASPECTOS INMUNES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.**

<http://campus.usal.es/~dermed/TEMA%2011.RESPUESTA%20INFLAMATORIA.pdf>.

2009/05/06

**45. MEDICINA NATURAL-EXTRACCIÓN**

[http://plantasmedicinalesjey.blogspot.com/2010\\_04\\_11\\_archive.html](http://plantasmedicinalesjey.blogspot.com/2010_04_11_archive.html)

2010-15-04

**46. MEDICINA NATURAL. La Granadilla**

<http://mednaturaagradafamilia.blogspot.com/2009/10/la-granadilla-pasiflora-ligularis-juss.html>

2012-03-12

**47. MEDICINA TRADICIONAL HERBOLARIA.**

[http://www.medicos.us/doctores/servicios/medicina/medicina\\_tradicionalherbolaria/](http://www.medicos.us/doctores/servicios/medicina/medicina_tradicionalherbolaria/)

2008/02/15

**48. MEDICINA NATURAL Y TRADICIONAL DE REMEDIOS**

<http://www.ecoaldea.com/articulos/Pasiflora.htm>

2009/01/20

**49. NATURAMEDIC (Terapias)**

<http://www.naturamedic.com/fitoterapia.htm>

2009/01/20

**50. NEUROFISIOLOGIA, CLÍNICA Y TRATAMIENTOS DE TRASTORNOS DE ANSIEDAD**

[http://cuartasingularidad.com/events/libro\\_trastorno\\_de\\_ansiedad.pdf](http://cuartasingularidad.com/events/libro_trastorno_de_ansiedad.pdf)

2012-06-07

**51. NIVELES DE ANSIEDAD EN ETAPA PRECOMPETITIVA Y COMPETITIVA**

<http://www.wisis.ufg.edu.sv/www.wisis/documentos/TE/152-46-G283n/152-46-G283nCapitulo%20II.pdf>

2012-03-12

**52. OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS IN THIN LAYER CHROMATOGRAPHY OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS**

[http://public.carnet.hr/cccaa/CCA-PDF/cca2004/v77n1\\_n2/CCA\\_77\\_2004361-366\\_medicsaric2.pdf](http://public.carnet.hr/cccaa/CCA-PDF/cca2004/v77n1_n2/CCA_77_2004361-366_medicsaric2.pdf)

**53. PROPIEDADES DE LA PASSIFLORA PARA ENFERMEDADES NERVIOSAS Y DEJAR DE FUMAR**

<http://blogdefarmacia.com/propiedades-de-la-passiflora-para-enfermedades-nerviosas-y-dejar-de-fumar/>

2012-03-12

**54. PROPIEDADES MEDICINALES DE LA PASIFLORA**

<http://www.plantasparacurar.com/propiedades-medicinales-de-la-pasiflora/>

2012-03-12

**55. PSICOLOGIA**

<http://www.portalcantabria.es/Psicologia/58.php>

2012-06-07

**56. PSICOTERAPIA E HIPNOSIS EN GUATEMALA**

<http://hipnoterapia.wordpress.com/2009/06/10/trastornos-signos-y-sintomas-de-ansiedad/>

2012-03-12

**57. REVISTA CUBANA. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-  
QUÍMICA DE PASSIFLORA INCARNATA L. PARA  
SU USO EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

<http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=CARACTERIZACI%C3%93N+FISICOQU%C3%8DMICA+DE+PASSIFLORA+INCARNATA+L.+PARA+SU+USO+EN+LA+INDUSTRIA+FARMAC%C3%89UTICA&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fajs.uo.edu.cu%2Findex.php%2Fcq%2Farticle%2Fdownload%2F2196%2F1738&ei=eJC1UKaKFY2o8ATJkYGYCg&usg=AFQjCNF9MBzO3AdyMPNBmEIaKf5ioGEQ9g&cad=rja>

2012-03-12

**58. SINTOMAS DE LA ANSIEDAD GENERALIZAD**

<http://www.innatia.com/s/c-controlar-la-ansiedad/a-sintomas-de-ansiedad.html>

2012-03-12

**59. TIPOS DE ANSIEDAD**

<http://ansiedad.comocombatir.com/tipos-de-ansiedad>

2012-03-12

**60. TODO SOBRE ANSIEDAD**

<http://www.todosobrelaansiedad.com/ansiedad/ansioliticos-uso-o-abuso/>

2012-03-12

**61. TRASTORNOS DE ANSIEDAD**

<http://healthinmind.com/Spanish/PTSD.htm>

2012-03-12

**62. TRASTORNO POR ESTRÉS POSTRAUMATICO**

<http://www.1on1health.com/web/info/anxiety/spanish/posttraumatic-stressdisorder/Content>

2012-03-12

**63. TRASTORNO ANSIEDAD GENERALIZADA**

<http://es.scribd.com/doc/3519027/Trastorno-Ansiedad-Generalizada>

2012-06-07

**64. TRASTORNO OBSESIVO-COMPULSIVO**

<http://www.dmedicina.com/enfermedades/psiquiatricas/trastorno-obsesivo-compulsivo>

2010-08-06

**65. STUDIES IN NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY. Volumen 35 Bioctive Natural Products (Part O).**

[http://www.cee.unifesp.br/so\\_cap\\_12.pdf](http://www.cee.unifesp.br/so_cap_12.pdf)

2010/09/17

**66. VADEMECUM**

<http://www.vademecum.es/principios-activos-diazepam-n05ba01>

2012-06-20

**67. VALIDACIÓN DEL EFECTO SEDATIVO, ANTIEDEMATIZANTE Y TOXICIDAD DE VALERIANA OFFICINALIS (VALERIANA); MELISSA OFFICINALIS (MELISA); THYMUS VULGARIS (TOMILLO); FOENICULUM VULGARE (HINOJO); PASSIFLORA INCARNATA (FLOR DE LA PASIÓN O MARACUYÁ) EN RATONES.**

[http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes\\_Finales\\_Investigacion/IF\\_SETIEMBRE\\_2012/IF\\_CARDENAS%20TENORIO\\_FCS.pdf](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_SETIEMBRE_2012/IF_CARDENAS%20TENORIO_FCS.pdf)

2012-04-12

**68. VALIDACIÓN MODELOS ANIMALES**

[http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/1/LAJOP\\_21\\_1\\_1\\_1\\_2209A83831.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/1/LAJOP_21_1_1_1_2209A83831.pdf)

2012-06-20

**69. VARIANTES QUE INTERFIEREN EN LA  
CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS Passiflora.**

<http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=parametros+fitoquimicos+de+las+flores+de+granadilla+para+fitomedicamentos&source=web&cd=4&ved=0CDYQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F75%2F75132%2Fde-29082007100757%2Fpublico%2FMariaCeliaHibariReimberg.pdf&ei=AWk1UKKuLoio8ASjmoEI&usg=AFQjCNE mpWT8jZD3N5vb2SDWqlFo2KCwJw>

2012-06-07

## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

#### ANEXO 1. SECADO Y MOLIENDA DE FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*).



#### ANEXO 2. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*).

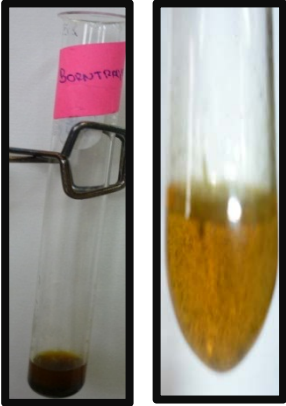

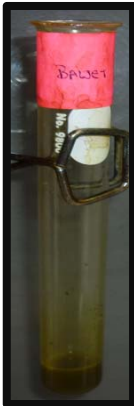



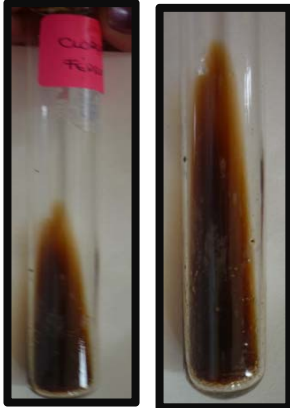




**ANEXO3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CENIZAS DE FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*).**



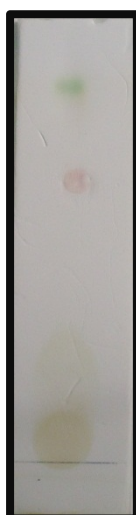


**ANEXO 4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO DE FLORE DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*).**

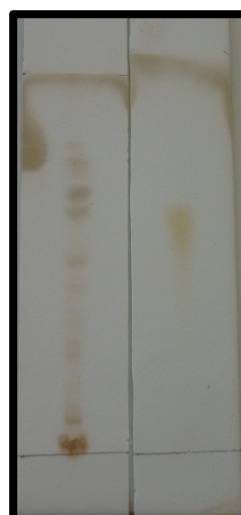
		
<p><b>ENSAYO DE DRAGENDORFF</b></p>	<p><b>ENSAYO DE WAGNER</b></p>	<p><b>ENSAYO DE BALJET</b></p>
		
<p><b>ENSAYO DE BORNTRAGER</b></p>	<p><b>ENSAYO DE SUDAN III</b></p>	<p><b>ENSAYO DE RESINAS</b></p>
		
<p><b>ENSAYO DE CLORURO FERRICO</b></p>	<p><b>ENSAYO DEMUCILAGOS</b></p>	<p><b>ENSAYO DE ESPUMA</b></p>



**ANEXO 5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO DE FLOR DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*).**

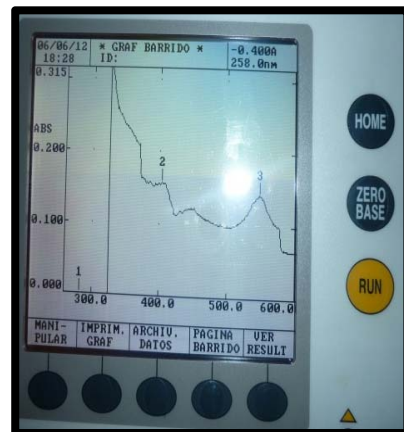
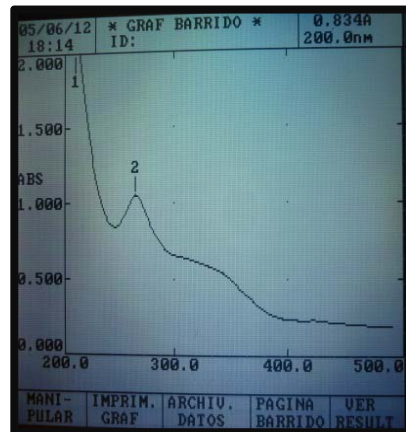
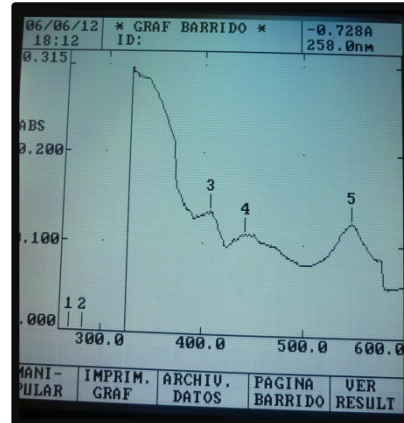


**ALCALOIDES**



**FLAVONOIDES**

## ANEXO 6. CUANTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA.



## ANEXO 7. ADMINISTRACION



## ANEXO 8. EXTRACCION DE LOS ORGANOS





ANEXO 9.

Protocolo Histopatológico de ratones <i>muss musculus</i> que se les administro extracto hidroalcohólico de flor de granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> ) en el mes de septiembre.		
Muestra	Examen Macroscópico	Examen Microscópico
NA-12 465-1	Aspecto: Normal Color: Pardo-Rojizo <b>Tamaño</b> <u>Derecho</u> : Largo: 1.1 cm Ancho: 0.6 cm Grosor: 0.4 cm <u>Izquierdo</u> : Largo: 0.7 cm Ancho: 0.6 cm Grosor: 0.4 cm	<b>Estructura Histológica Riñón</b> Glomérulos con la integridad de la capsula y la membrana epitelial; espacio de Bowman adecuado; Túbulos renales de calibre normal.
NA-12 465-2	Aspecto: Normal Color: Pardo-Rojizo <b>Tamaño</b> Largo: 2.4 cm Ancho: 1.4 cm Grosor: 0.6 cm	<b>Estructura Histológica Hígado</b> Lobulillos hepáticos de arquitectura normal; Hepatocitos de tamaño normal; Sinusoides adecuados; espacios porta y vena centro lobulillar normal.
NA-12 465-3	Aspecto: Normal Color: Rosado <b>Tamaño</b> Largo: 1.4 cm Ancho: 0.7 cm Grosor: 0.3 cm	<b>Estructura Histológica Estomago</b> Mucosa gástrica con glándulas de distribución y calibre normal; integridad de la muscularis mucosae. Pared muscular y peritoneos íntegros.
NA-12 465-4	Aspecto: Normal Color: Pardo-Rojizo <b>Tamaño</b> Largo: 2.4 cm Ancho: 1.4 cm Grosor: 0.6 cm	<b>Estructura Histológica Hígado</b> Hepatocitos de tamaño normal; espacios porta y vena centro lobulillar normal, Sinusoides adecuados; Lobulillos hepáticos de arquitectura normal.

Dr. Oswaldo Duque  
Médico Patólogo

## ANEXO 10. ANOVA

### ANOVA TEST DE ACTIVIDAD EXPLORATORIA (LABERINTO)

Anova Un Factor					
Variable Respuesta: Actividad Exploratoria					
Variable Explicativa: Grupos					
Número de Casos: 18					
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	44.9080	5	8.9816	223.2071	0.0002E-7
Dentro Grupos	0.4829	12	0.0402		
Total (corr.)	45.3909	17			

### ANOVA TEST DE TEST DE CURIOSIDAD

Anova Un Factor					
Variable Respuesta: Curiosidad					
Variable Explicativa: Grupos					
Número de Casos: 18					
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	753.1647	5	150.6329	224.3472	0.0002E-7
Dentro Grupos	8.0571	12	0.6714		
Total (corr.)	761.2218	17			

### ANOVA TEST INCAPACITACIÓN MOTRIZ (CHIMENEA)

Anova Un Factor					
=====					
Variable Respuesta:	Incapacitación Motriz				
Variable Explicativa:	Grupos				
Número de Casos:	18				
-----					
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
-----					
Entre Grupos	49.9864	5	9.9973	292.9843	0.0004E-8
Dentro Grupos	0.4095	12	0.0341		
-----					
Total (corr.)	50.3958	17			
-----					

### ANOVA TEST DE ACTIVIDAD MIORELAJANTE (ROTA-ROD)

Anova Un Factor					
=====					
Variable Respuesta:	Actividad Miorelajante				
Variable Explicativa:	Grupos				
Número de Casos:	18				
-----					
	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	23.9899	5	4.7980	430.3123	0.0004E-9
Dentro Grupos	0.1338	12	0.0111		
-----					
Total (corr.)	24.1237	17			
-----					

